



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

RAFAEL MATOS XIMENES

**ATIVIDADE ANTIFOSFOLIPÁSICA A₂ DA HARPALICINA 2, UMA
ISOFLAVONA ISOLADA DE *Harpalyce brasiliiana* Benth.**

Fortaleza
2012

RAFAEL MATOS XIMENES

**ATIVIDADE ANTIFOSFOLIPÁSICA A₂ DA HARPALICINA 2, UMA
ISOFLAVONA ISOLADA DE *Harpalyce brasiliiana* Benth.**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Fortaleza

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- X87a Ximenes, Rafael Matos.
Atividade antifosfolipásica A₂ da harpalicina 2, uma isoflavona isolada de *Harpalyce
brasiliiana* Benth. / Rafael Matos Ximenes. – 2012.
134 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde,
Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2012.
Área de concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.
1. Venenos. 2. Fosfolipase A₂. 3. Inibidores Enzimáticos. I. Título.

CDD 615.9

RAFAEL MATOS XIMENES

**ATIVIDADE ANTIFOSFOLIPÁSICA A₂ DE HARPALICINA 2, UMA
ISOFLAVONA ISOLADA DE *Harpalyce brasiliana* Benth.**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Renata Mendonça Araújo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandes
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Aos meus exemplos de vida



AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão primeiramente a minha Família, pelo apoio incondicional, e aos Professores, Helena, Alexandre, Marcos e Marcelo, pelos ensinamentos científicos, mas principalmente pelo exemplo e amizade. Para não correr o risco de esquecer nomes importantes, agradeço a todos, Amigos e colegas, que contribuíram para execução deste trabalho e para a alegria de todos estes anos.

A simplicidade não é uma virtude que se some a existência. É a própria existência, enquanto nada a ela se soma. Por isso é a mais leve das virtudes, a mais transparente e a mais rara. [...] Entre duas demonstrações, entre duas hipóteses, entre duas teorias, os cientistas costumam privilegiar a mais simples: é apostar na simplicidade do real, mais do que na força do nosso espírito.

André Comte-Sponville

RESUMO

As fosfolipases A₂ secretórias (sPLA₂, EC 3.1.1.4) hidrolisam a ligação éster *sn*-2 dos fosfolipídios, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios. A expressão destas enzimas esta elevada em diversas condições patológicas como, artrite reumatóide, sepse, aterosclerose e câncer. Além disto, as sPLA₂s são os principais componentes tóxicos dos venenos de algumas serpentes, sendo os principais responsáveis pelo dano tecidual local. A harpalicina 2 é uma isoflavona isolada das folhas de *Harpalyce brasiliiana* Benth., uma raiz-de-cobra utilizada na medicina popular do Nordeste para tratar envenenamentos por serpentes e condições inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da harpalicina 2 nas atividades enzimática, edematogênica e miotóxica de sPLA₂s isoladas dos venenos de *Bothrops pirajai* (PrTX-III), *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15), *Apis mellifera* (Apis) e *Naja naja* (Naja). Além disso, o efeito sobre agregação plaquetária induzida pela piratoxina-III (PrTX-III) em decorrência do tratamento com a harpalicina 2 também foi avaliado. A harpalicina 2 inibiu todas as sPLA₂s testadas, com percentuais de inibição de 58,7, 78,8, 87,7 e 88,1 % para PrTX-III, Cdt F15, Apis e Naja, respectivamente. A primeira fase da atividade edematogênica induzida pela administração das sPLA₂s também foi inibida pela harpalicina 2, assim como a miotoxicidade. Quando avaliada especificamente sobre a PrTX-III, em comparação com os inibidores padrão, ácido aristolóchico (Aris Ac) e brometo de p-bromofenacila (p-BPB), a IC₅₀ da harpalicina 2 sobre a atividade enzimática foi de 11,34 ± 0,28 µg/mL. Alterações conformacionais como um leve desenovelamento e a transição da forma dimérica para monomérica também foram observadas após o tratamento com a harpalicina 2, sem contudo alterar a massa da proteína. Nos experimentos de agregação plaquetária, a harpalicina 2 incubada previamente com a PrTX-III inibiu a agregação quando comparada a proteína não tratada. O efeito inibitório do ácido aristolóchico e do p-BPB foram menores do que os da harpalicina 2, que também inibiu a agregação induzida pelo ácido araquidônico. Os resultados de docking, obtidos utilizando as estruturas cristalográficas das sPLA₂s oriundas do *Protein Data Bank*, revelaram uma tendência entre os valores dos GOLD scores e os percentuais de inibição da atividade enzimática e de agregação plaquetária, apontando a formação de ligações de hidrogênio entre a harpalicina 2 e resíduos importantes do sítio ativo das sPLA₂s, como a histidina-48. Em conclusão, estes resultados mostraram o efeito inibitório da harpalicina 2 sobre as atividades enzimáticas e tóxicas das sPLA₂s, corroborando, em parte, o uso da *H. brasiliiana* na medicina popular.

Palavras-chave: *Harpalyce brasiliiana*, harpalicina 2, fosfolipase A₂, veneno

ABSTRACT

Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂, EC 3.1.1.4) hydrolyses the *sn*-2 ester bond of phospholipids, releasing fatty acids and lysophospholipids. The expression of these enzymes is found to be elevated in many pathological conditions, such as rheumatoid arthritis, sepsis, atherosclerosis, and cancer. Moreover, sPLA₂s are the main toxic components of some snake venoms, being the mainly responsible for the local tissue damage. Harpalycin 2 is an isoflavona isolated from the leaves of *Harpalyce brasiliiana* Benth., a snakeroot used in folk medicine to treat snake bites and inflammation in Northeast of Brazil. The aim of this study was evaluate the effect of harpalycin 2 in the enzymatic, edematogenic, and myotoxic activities of sPLA₂s isolated from *Bothrops pirajai* (PrTX-III), *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15), *Apis mellifera* (Apis), and *Naja naja* (Naja) venoms. Futher, the effect on the platelet aggregation induced by PrTX-III as a result of the treatment with harpalycin 2 was also evaluated. Harpalycin 2 inhibited all sPLA₂s tested, with inhibition percentages of 58.7, 78.8, 87.7, and 88.1 % for PrTX-III, Cdt F15, Apis, and Naja, respectively. The early phase of the edema induced by sPLA₂s administration was also inhibited by harpalycin 2, as well as the myotoxicity. When assayed specifically with the PrTX-III, in comparison with two standard sPLA₂ inhibitor, aristolochic acid (Aris Ac) and *p*-bromophenacyl bromide (*p*-BPB), the IC₅₀ of harpalycin 2 on the enzymatic activity was 11.34 ± 0.28 µg/mL. Conformational changes as a slightly unfolding and the transition from the dimeric to the monomeric form were also observed after treatment with the harpalycin 2, with no changes in the molecular mass of the protein. In the platelet aggregation assays, the harpalycin 2 incubated with the PrTX-III inhibited the aggregation when compared to the untreated protein. The inhibitory effect of Aris Ac and *p*-BPB were lower than that of harpalycin 2, which also inhibited the aggregation induced by arachidonic acid. The docking results, using the crystallographic structures of the sPLA₂s taken from the *Protein Data Bank*, showed a trend between the GOLD scores and the percentages of catalytic activity and platelet aggregation inhibition, showing the formation of hydrogen bonds between harpalycin 2 and important residues in the active site of the sPLA₂s, as His48. In conclusion, these results showed the inhibitory effect of harpalycin 2 on the enzymatic and toxic activities of sPLA₂s, corroborating, at least in part, the use of *H. brasiliiana* in folk medicine.

Keywords: *Harpalyce brasiliiana*, harpalycina 2, phospholipase A₂, venem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Especificidade das fosfolipases.....	21
Figura 2	– Reação catalisada pela fosfolipase A ₂ , mostrando a hidrólise da ligação éster do carbono 2 do glicerol da 1-palmitoil-2-araquidonoil-fosfatidilcolina produzindo ácido araquidônico livre e 1-palmitoil-lisofosfatidilcolina	22
Figura 3	– Estrutura terciária esquemática de uma fosfolipase A ₂ secretória.....	26
Figura 4	– Mecanismos de catálise das sPLA ₂ s. a. tradicional, b. alternativo com a participação de duas moléculas de água..	27
Figura 5	– Papel das fosfolipases A ₂ secretórias do grupo IIA na aterogênese.*Matriz extracelular.	30
Figura 6	– Flavonoides estudados pelo Grupo de Pesquisa em Bioquímica de Macromoléculas, coordenado pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama. a. morina, b. rutina, c. naringina, e d. quercetina.....	37
Figura 7	– Fotos de diferentes partes de <i>H. brasiliiana</i> : (A) sementes, (B) flor, (C) raiz, (D) espécime completo em seu habitat.....	39
Figura 8	– Litogravura de <i>Harpalyce brasiliiana</i> Benth.....	40
Figura 9	– Estruturas do substrato sintético da sPLA ₂ , ácido 4-nitro-3-octanoil-oxibenzóico (4N3OBA), e do cromóforo, ácido 4-nitro-3-hidroxibenzoico, detectado em 425 nm.....	49
Figura 10	– Cascata do ácido araquidônico para produção de prostaglandinas e tromboxanos.....	51
Figura 11	– Cascata do ácido araquidônico para produção de leucotrienos.....	52
Figura 12	– Esquema da reação para detecção de tióis livres utilizando o reagente de Ellman.....	54
Figura 13	– Estrutura da harpalicina 2.....	63
Figura 14	– Efeito da harpalicina 2 (HP-2) sobre a atividade catalítica das fosfolipases A ₂ secretórias (sPLA ₂) dos venenos de <i>Bothrops pirajai</i> (PrTX-III), <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt	

- F15), *Apis mellifera* (Apis) e *Naja naja* (Naja) utilizando 4N3OBA como substrato e calculada através do aumento da absorbância (425 nm) após 20 min de reação. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com $*p < 0,05$ 64
- Figura 15 – Efeito da harpalicina 2 (HP-2) na formação do edema – medido em μ L – após injeção subplantar das sPLA₂s (25 μ g/pata) dos venenos de: **a.** *Bothrops pirajai* (PrTX-III), e **b.** *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com $*p < 0,05$ 65
- Figura 16 – Efeito da harpalicina 2 (HP-2) na formação do edema – medido em μ L – após injeção subplantar das sPLA₂s (25 μ g/pata) dos venenos de: **a.** *Apis mellifera* (Apis), e **b.** *Naja naja* (Naja). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com $*p < 0,05$ 66
- Figura 17 – Inibição pela harpalicina 2 da miotoxicidade induzida pelas sPLA₂s (25 μ g/animal) dos venenos de *Bothrops pirajai* (PrTX-III), *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15), *Apis mellifera* (Apis) e *Naja naja* (Naja) avaliada pela liberação de creatina quinase (CK) no plasma. Dados expressos como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com $*p < 0,05$ 67
- Figura 18 – Tendência observada entre os resultados *in silico* (GOLD Scores) e os *in vitro* (percentuais de inibição da atividade catalítica). Os valores próximos aos pontos representam os percentuais de inibição e os códigos de acesso do PDB. Códigos de acesso do PDB: 1GMZ (PrTX-III), 2QOG (Cdt F15), 1PSH (Naja) e 1POC (Apis)..... 69
- Figura 19 – Alinhamento das sequências de aminoácidos de PrTX-III, Cdt F15, Naja e Apis, obtidas pelas códigos de acesso do PDB: 1GMZ, 2QOG, 1PSH e 1POC, respectivamente. O

	programa ClustalX foi utilizando, com configuração padrão..	70
Figura 20	– Alinhamento estrutural das sPLA ₂ s (cartoon) com seus respectivos resultados de docking para harpalicina 2 (stick): PrTX-III em verde, Cdt F15 em vermelho e Naja em azul. Modelo gerado utilizando o programa PyMOL (DELANO, 2002).....	71
Figura 21	– Visão panorâmica da melhor solução de docking obtida com o alvo 1PSH (Naja). Os resíduos importantes envolvidos em interação intermoleculares com a harpalicina 2 estão evidenciados. O íon Ca ²⁺ presente no sítio catalítico também esta representado (magenta).....	72
Figura 22	– Visão detalhada da melhor solução de docking obtida com o alvo 1PSH (Naja). Os resíduos importantes envolvidos em interação intermoleculares com a harpalicina 2 estão evidenciados. O íon Ca ²⁺ presente no sítio catalítico também esta representado (magenta).....	73
Figura 23	– Efeito inibitório há harpalicina 2 (HP-2) e do brometo de <i>p</i> -bromofenacila (<i>p</i> -BPB) sobre a atividade enzimática da PrTX-III, utilizando o ácido 4-nitro-3-octanoil-oxibenzoico (4N3OBA) como substrato para a reação enzimática. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com * <i>p</i> < 0,05.....	74
Figura 24	– Cromatograma em coluna de fase reversa da PrTX-III e da PrTX-III incubada com a harpalicina 2 (PrTX-III:HP-2), monitorado em 280 nm.	75
Figura 25	– Avaliação da dimerização. a. Cromatografia de exclusão molecular da PrTX-III e da PrTX-III tratada previamente com harpalicina 2 (PrTX-III:HP-2). As amostras foram submetidas às mesmas condições cromatográficas; b. análise por SDS-PAGE em tricina confirmando os resultados da cromatografia (MK, marcador molecular)	76
Figura 26	– Espectrometria de massa (MALDI-TOF) com voltagem de aceleração de 25 kV, laser fixo em 2.890 µJ/com ² , atraso	

	de 300 ns e modo de análise linear. a. PrTX-III; b. PrTX-III:HP-2.....	77
Figura 27	– Análises espectroscópicas. a. Espectro de dicroísmo circular da PrTX-III e da PrTX-III tratada com harpalicina 2 (PrTX-III:HP-2). Os dados obtidos na faixa de 185 – 260 nm estão representados e os resultados dos espectros expressos em m ⁰ . b. Estão representadas as curvas de fluorescência da PrTX-III e da PrTX-III:HP-2.....	78
Figura 28	– Agregação plaquetária induzida pela administração de 10 µg de PrTX-III ou de PrTX-III tratada com harpalicina 2 (HP-2), ácido aristolóchico (Aris Ac) ou brometo de p-bromofenacila (p-BPB). a. Curva temporal, e b. Agregação após 8 minutos. Dados expressos como média ± E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com *p < 0,05.....	80
Figura 29	– Efeito da incubação das plaquetas com a harpalicina 2 (5 mg/mL) antes da administração de PrTX-III (10 µg) ou do ácido araquidônico (AA, 50 mM). a. Curva temporal, e b. Agregação após 8 minutos. Dados expressos como média ± E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com *p < 0,05.....	81
Figura 30	– Efeito da incubação das plaquetas com AACOCF3 (1 mM) ou indometacina (1 mM) antes da administração de PrTX-III (10 µg). a. Curva temporal, e b. Agregação após 8 minutos. Dados expressos como média ± E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com *p < 0,05.....	82
Figura 31	– Superposição das melhores soluções de docking para os inibidores harpalicina 2 (laranja), ácido aristolóchico (vermelho) e brometo de p-bromofenacila (verde). O álcool isopropílico cocrystalizado esta representado em cinza.....	83
Figura 32	– Visão detalhada da melhor solução de docking para a harpalicina 2. A ligação de hidrogênio (com 2,88 Å) está representada pela linha preta (----).....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fosfolipases A ₂ secretórias e suas fontes.....	24
Tabela 2 – Fosfolipases A ₂ secretórias de mamíferos.....	25
Tabela 3 – Inibição da atividade catalítica de enzimas pró-inflamatórias pela harpalicina 2.....	67
Tabela 4 – Detalhes dos resultados de <i>docking</i> e interações intermoleculares identificadas para os inibidores harpalicina 2 (HP-2), ácido aristolóchico (Aris Ac) e brometo de <i>p</i> -bromofenacila (<i>p</i> -BPB), utilizado a PrTX-III (1GMZ) como alvo.....	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	Fosfolipases A₂	21
2.1.1	<i>Estrutura e classificação</i>	22
2.1.2	<i>Mecanismo catalítico das fosfolipases A₂ secretórias</i>	26
2.1.3	<i>Papeis fisiológicos das fosfolipases A₂ secretórias e sua participação em algumas doenças humanas</i>	27
2.1.4	<i>Fosfolipases A₂ de venenos animais</i>	31
2.2	Inibidores de fosfolipases A₂ secretórias	35
2.2.1	<i>Produtos naturais como inibidores de fosfolipases A₂ secretórias</i>	36
2.2.2	<i>Harpalyce brasiliiana Benth.</i>	38
2.2.3	<i>Potencial terapêutico dos inibidores de fosfolipases A₂ secretórias</i>	41
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo geral	44
3.2	Objetivos específicos	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	Material	46
4.2	Material Botânico e Isolamento da Harpalicina 2	46
4.3	Animais	47
4.4	Avaliação geral da atividade antifosfolipásica A₂ da harpalicina 2	48
4.4.1	<i>Atividade catalítica</i>	48
4.4.2	<i>Indução de edema de pata</i>	49
4.4.3	<i>Mitotoxicidade</i>	50
4.4.4	<i>Atividade antiinflamatória in vitro</i>	50
4.4.5	<i>Modelagem molecular</i>	54
4.5	Caracterização do mecanismo de ação da harpalicina 2 na atividade enzimática e agregação plaquetária induzida pela piratoxina-III	56

4.5.1	<i>Atividade catalítica</i>	56
4.5.2	<i>Obtenção dos complexos PrTX-III:Harpalicina 2</i>	56
4.5.3	<i>Cromatografia de exclusão molecular</i>	57
4.5.4	<i>Espectrometria de massa</i>	57
4.5.5	<i>Dicroísmo circular</i>	58
4.5.6	<i>Agregação plaquetária</i>	59
4.5.7	<i>Modelagem molecular</i>	60
4.6	Análise estatística	61
5	RESULTADOS	63
5.1	Avaliação geral da atividade antifosfolipásica A₂ da harpalicina 2	63
5.2	Caracterização do mecanismo de ação da harpalicina 2 na atividade enzimática e agregação plaquetária induzida pela piratoxina-III	74
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	96
	APÊNDICES	112

Introdução

1. Introdução

As plantas medicinais são utilizadas desde os primórdios da humanidade para o tratamento de enfermidades que acometem homens e animais, desde simples ferimentos e processos inflamatórios a envenenamentos por animais peçonhentos como serpentes e insetos (MORS, 2000). As propriedades curativas das plantas dependem em grande parte da presença de substâncias oriundas de seu metabolismo secundário – ou especial, como alguns autores preferem chamar – pertencentes a classes químicas diversas, como os alcaloides, terpenoides e flavonoides (CSEKE *et al.*, 2006; EVANS, 2009).

Os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal, principalmente nas angiospermas, onde apresentam uma enorme diversidade estrutural. Eles são divididos em três classes principais: os flavonoides, os isoflavonoides e os neoflavonoides. *Os dois primeiros sendo os mais relevantes* (GARCÍA-LAFUENTE *et al.*, 2009; PRASAD *et al.*, 2010).

Várias atividades farmacológicas são relatadas na literatura científica para ambas as classes de flavonoides como, por exemplo, atividade anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, antiviral e anticâncer (GARCÍA-LAFUENTE *et al.*, 2009; HAVSTEEN, 2002). Diversos trabalhos têm mostrado a atividade antifosfolipase A₂ de flavonoides como a rutina (LINDAHL; TAGESSON, 1997), a morina (IGLESIAS *et al.*, 2005) e a quercetina (COTRIM *et al.*, 2011; CHIOU *et al.*, 2012). No entanto, apenas poucos trabalhos relatam essa atividade para isoflavonoides (DHARMAPPA *et al.*, 2010).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são uma classe de enzimas (EC 3.1.1.4) que catalisam a hidrólise da ligação éster no carbono 2 do glicerol dos fosfolipídios produzindo lisofosfolipídios e ácidos graxos livres, os quais servem de substrato para síntese de eicosanóides pró-inflamatórios – juntamente com espécies reativas de oxigênio - e de fator de agregação plaquetária (PAF) (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; LAMBEAU; GELB, 2008; NANDA *et al.*, 2007).

Elas são divididas em quatro classes principais: as fosfolipases A₂ secretórias (sPLA₂), as citosólicas (cPLA₂), as independentes de Ca²⁺ (iPLA₂) e as associadas a lipoproteínas (LpPLA₂). A classe das sPLA₂s é subdividida em dez grupos – conforme discutiremos adiante – vários dos quais estão envolvidos em

doenças inflamatórias, como sepse, aterosclerose, artrite reumatóide e câncer, desempenhado papéis não totalmente esclarecidos até o momento (BURKE; DENNIS, 2009; DHARMAPPA *et al.*, 2009; HAMAGUCHI *et al.*, 2003).

Além do envolvimento nos processos inflamatórios mencionados, as sPLA₂s são constituintes tóxicos de diversos venenos animais, principalmente de serpentes, cobras e abelhas. As sPLA₂s presentes nos venenos compartilham características estruturais com as sPLA₂s de mamíferos, principalmente as pertencentes aos grupos IA e IIA – incluindo as humanas – sobretudo em relação ao sítio ativo, o que as torna, por esse motivo, ferramentas úteis para o estudo de inibidores de sPLA₂s (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; BURKE; DENNIS, 2009; DHARMAPPA *et al.*, 2009; HAMAGUCHI *et al.*, 2003; LAMBEAU; GELB, 2008; NANDA *et al.*, 2007).

A administração exógena dessas enzimas a animais de experimentação induz uma resposta inflamatória similar àquela observada com a administração das sPLA₂s endógenas, além de provocar respostas mais específicas, como a necrose muscular e neurotoxicidade (COTRIM *et al.*, 2011; GIL *et al.*, 1997). Além disso, o número de estruturas cristalográficas depositadas em bancos de dados, como o RCSB Protein Data Bank (PDB) é bem maior para as sPLA₂s de venenos que para as de mamíferos, principalmente se forem humanas, devido a quantidade e facilidade de isolamento das primeiras em relação as últimas.

A terapêutica anti-inflamatória atual baseia-se principalmente no emprego de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), os quais inibem as enzimas ciclo-oxigenases-1 e -2 (COX-1/2) e lipoxigenases (LOX), e possuem efeitos adversos sérios, como sangramentos, danos a mucosa gástrica e complicações cardiovasculares. Além destes problemas, os inibidores de COX-1/2 e LOX não regulam a produção de fator de agregação plaquetária (PAF), o qual continua alimentando a resposta inflamatória (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; LAMBEAU; GELB, 2008).

Neste cenário, os inibidores seletivos de sPLA₂ seriam capazes de depletar tanto a cascata dos metabólitos pró-inflamatórios do ácido araquidônico quanto a produção de PAF, sem apresentar os efeitos adversos da terapia com o uso de corticosteroides, uma vez que estas enzimas só são secretadas em situações patológicas (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; BURKE; DENNIS, 2009; LAMBEAU; GELB, 2008; NANDA *et al.*, 2007).

A descoberta de novos fármacos a partir do estudo de fontes naturais pode seguir quatro abordagens principais: aleatória, quimiotaxonômica, etológica¹ e etnodirigida, onde está última apresenta de longe os melhores percentuais de êxito (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). *Harpalyce brasiliiana* Benth. (*Fabaceae*) é uma leguminosa utilizada na medicina popular do Nordeste do Brasil, onde é conhecida como raiz-de-cobra. Suas raízes são usadas para tratar picaduras de serpentes (DA SILVA *et al.*, 1999), enquanto suas folhas são utilizadas como anti-inflamatórias.

Nesta tese estão descritos os efeitos da harpalicina 2, uma isoflavona isolada das folhas de *H. brasiliiana*, nas atividades tóxicas de diferentes fosfolipases A₂ de venenos animais, além de fosfolipases A₂ de mamíferos e enzimas pró-inflamatórias. Além dos estudos bioquímicos e farmacológicos, buscando uma melhor compreensão dos resultados obtidos, a afinidade entre a harpalicina 2 e o sítio ativo das sPLA₂ testadas foi calculada utilizando programas de modelagem molecular.

¹ A abordagem etológica é um caminho recentemente apontado para a descoberta de novos fármacos baseado nos estudos de comportamento animal (etologia) com primatas. Esta abordagem tem como orientação avaliar a utilização de metabólitos secundários por animais, ou outras substâncias não nutricionais dos vegetais, com a finalidade de combater doenças ou controlá-las. Várias evidências a partir do uso de plantas por grandes símios africanos, no combate a infecções parasitárias (principalmente à malária), sinalizam positivamente para essa nova rota de investigação.

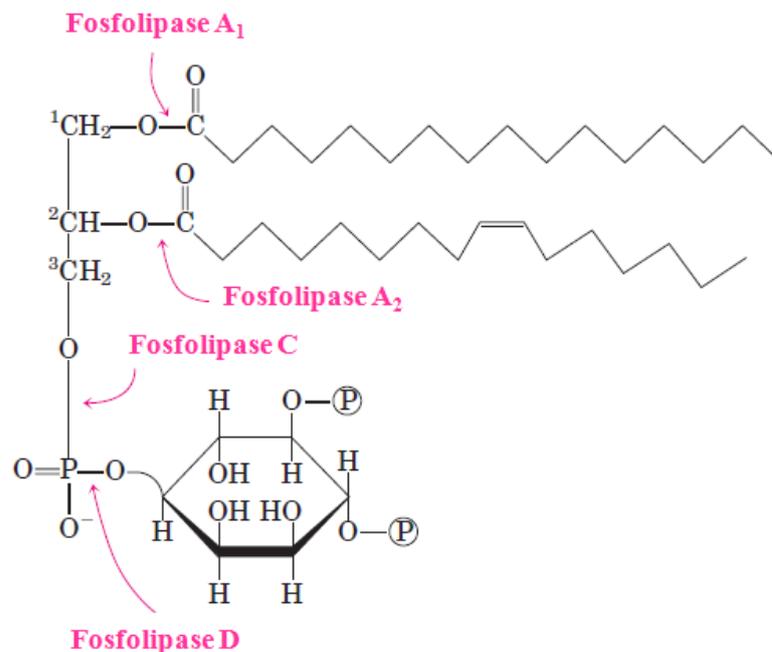
Fundamentação Teórica

2. Fundamentação teórica

2.1 Fosfolipases A₂

As fosfolipases A₂ compõem uma grande família de enzimas (EC 3.1.1.4) que catalisam a hidrólise da ligação éster no carbono 2 do glicerol dos fosfolipídios (FIGURA 1) (BOYANOVSKY; WEBB, 2009). Os produtos da catálise das fosfolipases A₂, um ácido graxo livre e um lisofosfolipídio, representam o primeiro estágio na produção de importantes segundos mensageiros responsáveis por diversos efeitos fisiológicos (FIGURA 2). Quando o ácido araquidônico é liberado da posição C2 dos fosfolipídios, este pode ser convertido em diferentes eicosanóides através da ação de várias enzimas. Enquanto que o lisofosfolipídio pode ser convertido em ácido lisofosfatídico ou ser acetilado dando origem ao fator de agregação plaquetária (PAF), ambos mediadores com potentes efeitos biológicos (BURKE; DENNIS, 2009).

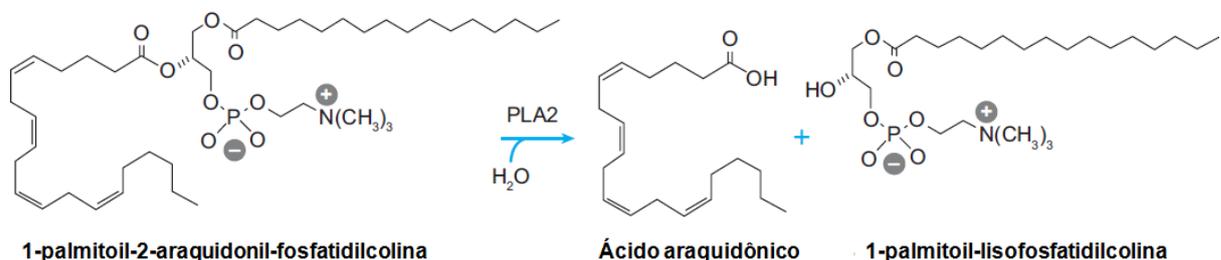
Figura 1 – Especificidade das fosfolipases.



Fonte: Nelson e Cox (2004).

Estas enzimas sempre foram de grande interesse para bioquímicos devido à capacidade de atuar na interface de superfícies hidrofílicas e lipofílicas (LAMBEAU; DENNIS, 2008). Nas últimas décadas, estas enzimas têm despertado também o interesse médico devido ao envolvimento em diferentes condições patológicas humanas, como na sepse, lesão de isquemia-reperfusão, aterosclerose, artrite reumatoide e, mais recentemente, no câncer (BOBIK, 2009; COULTHARD *et al.*, 2011; DIVCHEV; SCHIEFFER, 2008; TOYAMA *et al.*, 2012; VAN DIJK *et al.*, 2009), além de participarem do quadro patológico do envenenamento por diversos animais peçonhentos, notadamente por serpentes e abelhas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009; KANG *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Figura 2 – Reação catalisada pela fosfolipase A₂, mostrando a hidrólise da ligação éster do carbono 2 do glicerol do 1-palmitoil-2-araquidonoil-fosfatidilcolina produzindo ácido araquidônico livre e 1-palmitoil-lisofosfatidilcolina.



Fonte: Lambeau e Gelb (2008).

2.1.1 Estrutura e classificação

A superfamília das fosfolipases A₂ é composta por 15 (quinze) grupos, os quais são subdivididos em vários subgrupos, cada qual com diferenças estruturais e funcionais. No entanto, são quatro as principais classes de fosfolipases A₂ de interesse médico-científico: as secretórias (sPLA₂s), as citosólicas (cPLA₂s), as independentes de Ca²⁺ (iPLA₂s), e as associadas a lipoproteínas (LpPLA₂s) (KANG *et al.*, 2011). Neste texto, nos deteremos nas características detalhas das fosfolipases A₂ secretórias.

A atividade fosfolipásica A_2 foi estudada primeiramente por volta de 1890 utilizando venenos de cobras. O sistema de numeração dos grupos foi originalmente usado para diferenciar as sPLA₂s dos diferentes venenos ofídicos, sendo seu primeiro uso relatado em 1977 para distinguir entre os venenos de cascaveis e víperas (serpentes) dos venenos de espécies de Elapidae dos gêneros *Naja* e *Bungarus* (cobras), baseado no padrão de distribuição das pontes dissulfeto (BURKE; DENNIS, 2009). Logo em seguida várias sPLA₂s foram isoladas de outros organismos, incluindo mamíferos (TABELA 1). O termo fosfolipases A_2 secretórias (sigla em inglês sPLA₂) foi usado inicialmente devido a grande concentração de sPLA₂s do grupo IIA no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, mas o “s” posteriormente ficou designando secretória (*secreted*) (BURKE; DENNIS, 2009).

Em mamíferos, foram identificados onze grupos de sPLA₂s, os quais foram numerados e agrupados na ordem em que foram descobertos: grupo IB (GIB), IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA e XIIB. A distribuição tissular; os papéis fisiológicos; e as preferências por substratos específicos estão listados na Tabela 2. Todas as sPLA₂s possuem um par histidina/aspartato formando o centro catalítico e um *loop* de ligação ao Ca^{2+} que é essencial para a função da enzima (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; LAMBEAU; GELB, 2008).

Apesar de não apresentarem uma alta homologia na sequência de aminoácidos (20 – 50% de identidade), as sPLA₂s compartilham a massa molecular (14 – 16 kDa) e são ricas em pontes dissulfeto. Estas pontes dissulfeto formam a base de uma segunda classificação das sPLA₂s de mamíferos. A primeira dessas subclasses é composta pelos grupos I, II, V e X, os quais possuem homologia na estrutura primária e uma sobreposição parcial das pontes dissulfeto (de 6 a 8 pontes). A segunda subclasse é formada pelo grupo III, um membro atípico das sPLA₂s com 55 kDa, que contem um domínio central semelhante ao da sPLA₂ do veneno de abelha, ladeados por uma cadeia N-terminal de 130 aminoácidos e uma C-terminal de 219 aminoácidos. Por fim, a terceira subclasse é composta pelo grupo XIIA, com seu *loop* de ligação ao Ca^{2+} atípico e pelo XIIB, que possui uma mutação no sítio ativo (leucina em vez de histidina na posição 48) que inativa sua atividade catalítica, sendo por isso considerada como um homólogo de sPLA₂ (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; BURKE; DENNIS, 2009; LAMBEAU; GELB, 2008; MURAKAMI *et al.*, 2010).

Tabela 1 – Fosfolipases A₂ secretórias e suas fontes.

Grupo	Organismos	Massa molecular (kDa)	Pontes dissulfeto
IA	Cobras	13 – 15	7
IB	Mamíferos	13 – 15	7
IIA	Serpentes, mamíferos	13 – 15	7
IIB	Serpentes (<i>Bitis gabonica</i>)	13 – 15	6
IIC	Mamíferos	15	8
IID	Mamíferos	14 – 15	7
IIE	Mamíferos	14 – 15	7
IIF	Mamíferos	16 – 17	6
III	Lagartos, abelhas e mamíferos	15 – 18 ou 55 (mamíferos)	8
V	Mamíferos	14	6
IX	<i>Conus</i> spp.	14	6
X	Mamíferos	14	8
XIA	Arroz (PLA ₂ -I)	12,4	6
XIB	Arroz (PLA ₂ -II)	12,9	6
XII	Mamíferos	19	7
XIII	Parvovirus	<10	0
XIV	Fungos e bactérias	13 – 19	2

Fonte: Burke e Dennis (2009).

Tabela 2 – Fosfolipases A₂ secretórias de mamíferos.

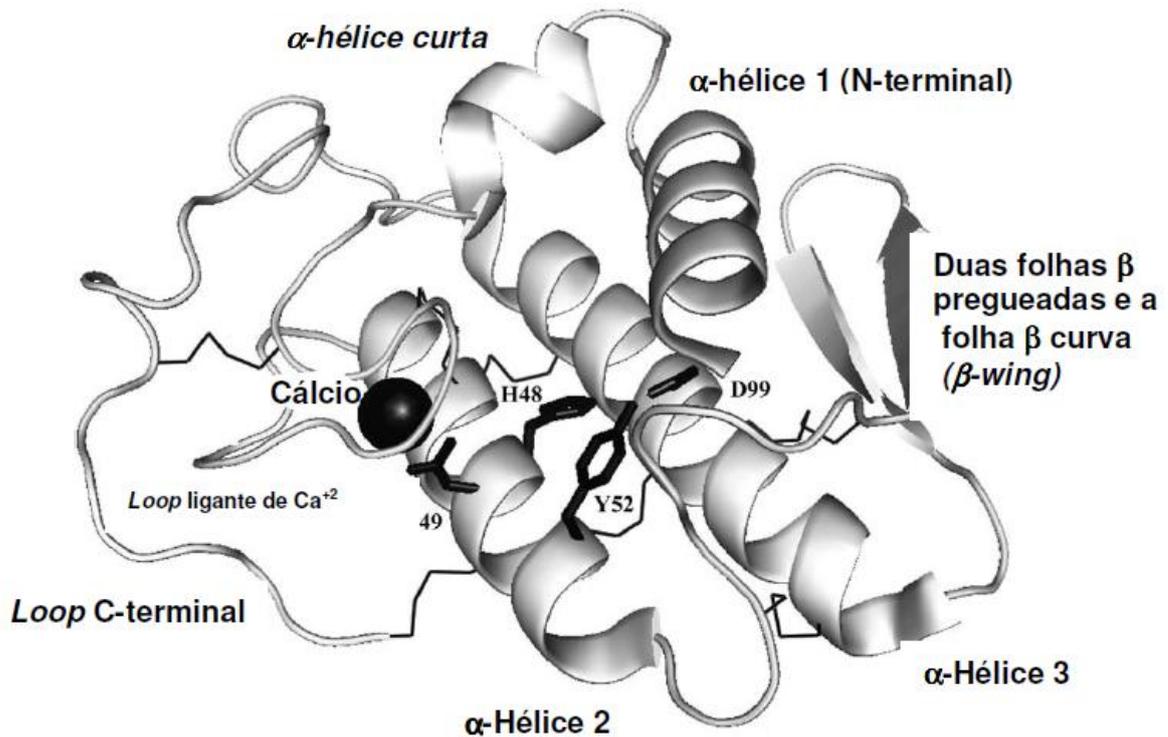
Grupo sPLA ₂	Distribuição tissular	Características e funções fisiológicas	Atividade catalítica	Receptores
I B	Suco pancreático, pulmão, fígado, baço, rim, ovário e cérebro	Digestão de fosfolipídios da dieta, antibacteriana, produção de eicosanoides, contração celular	PG > PS > PC	Tipo M
II A	Plasma, mucosa intestinal, glândula lacrimal e epitélio prostático	Proteína de fase aguda, antibacteriana, aterogênica, proliferação celular, migração e apoptose	PG > PS > PC	Tipo M e tipo N HSPG
C	Testículos e pâncreas	N/D	PG >> PC	Baixa afinidade - tipo M
D	Pâncreas, baço, timo, pele, ovário, pulmão e eosinófilos	N/D	Baixa atividade catalítica PG ~ PC	Baixa afinidade - tipo M
E	Tireoide, útero e embrião	Antibacteriana	PG > PC	Tipo M
F	Placenta, testículo, timo, fígado e rim	Antibacteriana	PG > PC	Tipo M
III	Rim, coração, fígado, músculo esquelético, placenta e leucócitos	Alto peso molecular, Antiviral	PG > PC	Baixa afinidade - tipo M
V	Coração, olho, pâncreas, macrófagos, neutrófilos e mastócitos	Antibacteriana, antiviral, aterogênica, produção de eicosanoides, fagocitose	PE > PC > PS	HSPG Tipo M
X	Intestino, pulmão, testículo, estômago, neutrófilos e macrófagos	Secretada com zimogênio, antibacteriana, antiviral, aterogênica, produção de eicosanoides	PC > PS	Tipo M
XII A	Coração, músculo esquelético, rim e pâncreas	Antibacteriana	Baixa atividade catalítica PG > PS >> PC	Baixa afinidade - tipo M
B	Fígado, rim, músculo esquelético e coração	N/D	Inativa	Não se liga ao tipo M

Nota: Os dados de GIB e GIIA são de humanos; GV e GX de humanos e camundongos; das demais sPLA₂s são de camundongos. N/D (não determinado), PG (fosfatidilglicerol), PS (fosfatidilserina), PC (fosfatidilcolina), HSPG (proteoglicanos heparan sulfato).

Fonte: Boyanovsky e Webb (2009).

Um exemplo de estrutura terciária de uma fosfolipase A₂ secretória pode ser visto na Figura 3, onde o íon Ca²⁺ está representado por uma esfera preta e as pontes dissulfeto, delineadas por linhas finas.

Figura 3 – Estrutura terciária esquemática de uma fosfolipase A₂ secretória.



Fonte: Teixeira (2009).

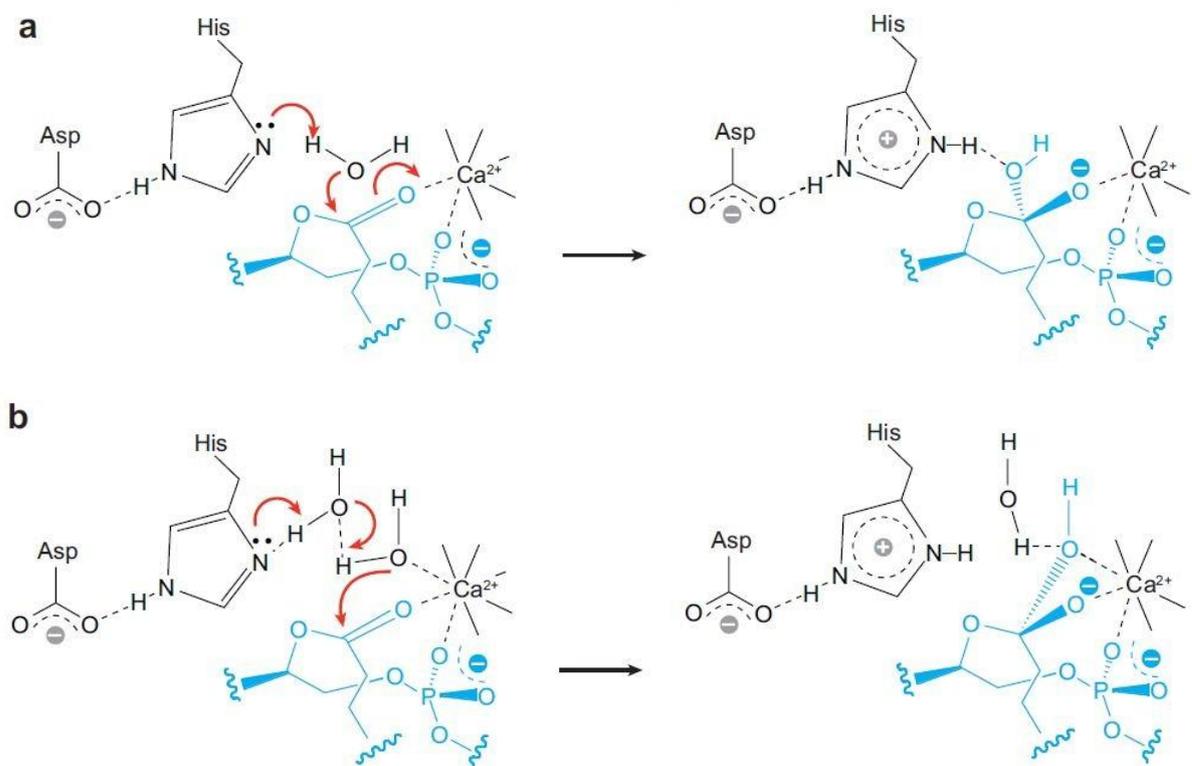
2.1.2 Mecanismo catalítico das fosfolipases A₂ secretórias

A histidina está presente no sítio ativo de todas as sPLA₂s ativas, formando com o aspartato o centro catalítico da enzima. A hidrólise é catalisada pela enzima através da ativação de uma molécula de água pela extração de um próton e o ataque a ligação éster do fosfolipídio. Este mecanismo explica a dependência do pH entre 7 e 9 (BURKE; DENNIS, 2009).

Trabalhos recentes utilizando fosfolipídios sintéticos como substrato demonstraram que a velocidade da hidrólise é proporcional ao acesso da molécula de água no sítio ativo. Além disso, a enzima liga o íon Ca²⁺ através do resíduo Asp49, e dos oxigênios das carbonilas dos resíduos de Tyr28, Gly30 e 32. O íon

Ca^{2+} é necessário para hidrólise, pois o mesmo coordena a carga negativa do oxigênio do fosfato e da carbonila, favorecendo o ataque ao carbono da carbonila da ligação éster. A Figura 4 ilustra esse mecanismo catalítico, bem como outro mecanismo recentemente proposto onde ocorre a participação de duas moléculas de água (BURKE; DENNIS, 2009; LAMBEAU; GELB, 2008).

Figura 4 – Mecanismos de catálise das sPLA₂s. **a.** tradicional, **b.** alternativo com a participação de duas moléculas de água.



Fonte: Lambeau e Gelb (2008).

2.1.3 Papeis fisiológicos das fosfolipases A₂ secretórias e sua participação em algumas doenças humanas

Um panorama geral da localização e das funções das fosfolipases A₂ secretórias em mamíferos pode ser vista da Tabela 2. A participação das sPLA₂s na função (e disfunções!) do organismo esta longe de ser totalmente elucidada. No entanto, os papeis destas enzimas na imunidade inata, no processo inflamatório a

partir da geração de eicosanoides, na formação da placa aterosclerótica e nas lesões de isquemia-reperfusão já estão bem estabelecidos (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; DIVCHEV; SCHIEFFER, 2008; VAN DIJK *et al.*, 2009).

A principal função fisiológica – até o momento – das sPLA₂s (mais especificamente das do grupo IIA, com evidências mais recentes da envolvimento dos grupos X e V) é sua participação como componente do sistema imune inato com potente ação antimicrobiana, principalmente contra bactérias Gram-negativas (mas também contra as Gram-positivas), sendo aparentemente o principal fator antibacteriano no soro da fase aguda da inflamação. Neste sentido, observa-se que as sPLA₂ GIIA são encontradas em locais estratégicos no corpo, como por exemplo, nas lágrimas, sêmen e lúmen intestinal, além de estarem em concentrações elevadas no plasma de pacientes com quadros infecciosos, incluindo na sepse (BOILARD *et al.*, 2010; LAMBEAU; GELB, 2008).

Várias outras sPLA₂s (além do grupo IIA) possuem atividade antibacteriana determinada *in vitro*, mas o papel fisiológicos delas ainda não está esclarecido. A potência relativa das sPLA₂s para matar bactérias Gram-positivas *in vitro* é: grupo IIA > X > V > XII > IIE > IB, IIF (LAMBEAU; GELB, 2008). Além das sPLA₂s de mamíferos, as sPLA₂s de venenos também possuem atividade bactericida, incluindo as proteínas homólogas Lys49, que são cataliticamente inativas (SAMMY *et al.*, 2007; TORRES *et al.*, 2010).

Além de matar diretamente as bactérias, as sPLA₂s possuem uma atividade antibacteriana indireta, uma vez que ativam as células de defesa inflamatórias. O principal exemplo disso é a ativação neutrofílica induzida pela sPLA₂ GIIA, que leva a liberação de superóxido e enzimas bactericidas pelas neutrófilos ativados (BOYANOVSKY; WEBB, 2009).

A contribuição das sPLA₂s para imunidade inata não é resultado unicamente das suas ações antibacterianas, mas também da geração de moléculas moduladoras da resposta imune – prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas, ácido lisofosfatídico e PAF – a partir do ácido araquidônico e dos lisofosfolipídios resultantes da hidrólise dos fosfolipídios de membrana (BOYANOVSKY; WEBB, 2009). O papel pró-inflamatório da sPLA₂ GIIA está bem estabelecido e, atualmente, um possível efeito anti-inflamatório da sPLA₂ GV tem sido demonstrado. Os autores desse último estudo creditam a isto a falha dos ensaios clínicos com inibidores de sPLA₂, devido a inibição das formas pró-

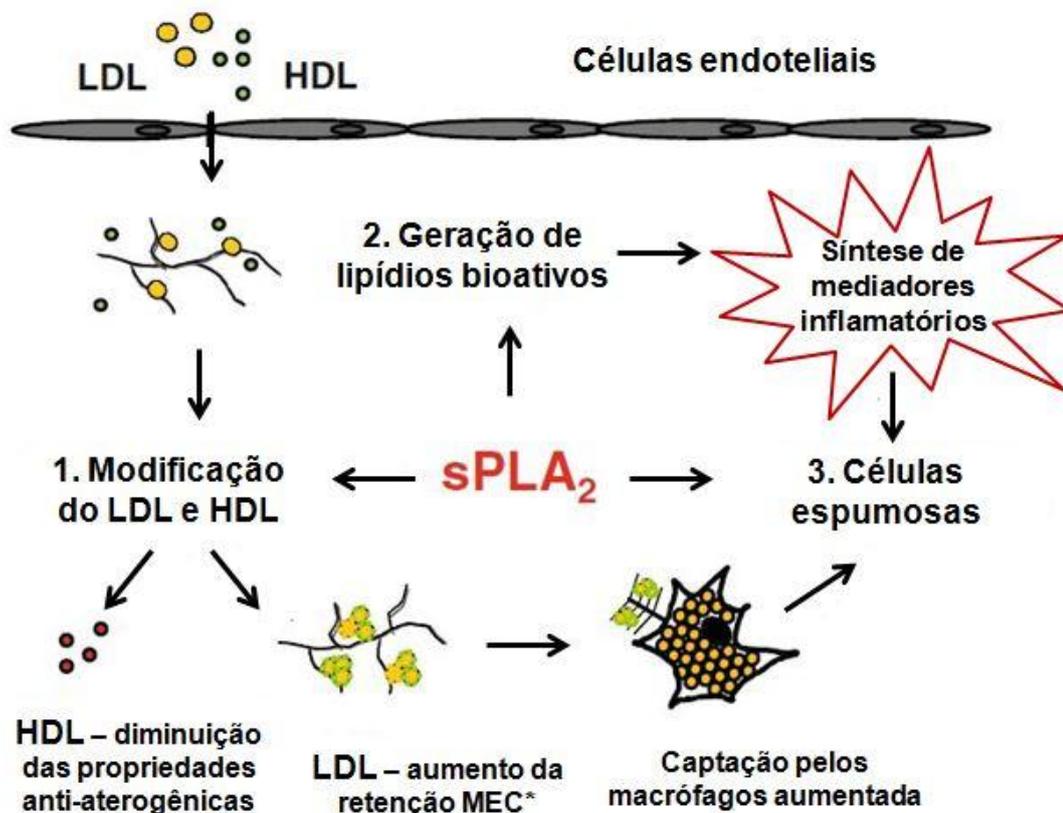
inflamatórias e anti-inflamatórias, o que resultaria na “estagnação” do processo inflamatório (BOILARD *et al.*, 2010).

Existem evidências da participação das sPLA₂s em várias outras condições patológicas, incluindo a artrite reumatóide, doenças neurodegenerativas como o Alzheimer, doença de Crohn e colite ulcerativa, choque séptico, síndrome da angústia respiratória do adulto, câncer e, como veremos a seguir, na aterosclerose (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; BURKE; DENNIS, 2009; DIVCHEV; SCHIEFFER, 2008; LAMBEAU; GELB, 2008; VAN DIJK *et al.*, 2009).

Nas lesões ateroscleróticas, as sPLA₂ GIIA estão altamente expressas, principalmente associadas a musculatura lisa e aos macrófagos. As evidências apontam para a modificação das lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL e LDL, respectivamente) como principalmente efeito pró-aterogênico das sPLA₂ GIIA, pois a hidrólise da camada lipídica das LDL aumenta a afinidade destas aos proteoglicanos da membrana basal dos vasos. Além disso, existem efeitos que são independentes da atividade catalítica, como a indução da diferenciação de monócitos a células dendríticas (macrófagos) e o aumento da produção de interleucina-6 (IL-6) por estas, com conseqüente estimulação da expressão de COX-2 nos mastócitos (BOBIK, 2009; BOYANOVSKY; WEBB, 2009; DIVCHEV; SCHIEFFER, 2008; IBEAS *et al.*, 2009).

O papel das sPLA₂ GIIA na aterogênese está esquematizado na Figura 5. Após o influxo para o espaço subendotelial, as partículas de HDL e LDL são hidrolisadas pela sPLA₂ dando origem a partículas aterogênicas de LDL, e diminuindo as propriedades anti-aterogênicas do HDL (1). Concomitante a isso, ocorre a geração de mediadores lipídicos pró-inflamatórios (2) e indução da diferenciação de monócitos a macrófagos ativados (3). O LDL modificado fica mais tempo retido na matriz extracelular, sendo fagocitado e dando origem as células espumosas (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; IBEAS *et al.*, 2009).

Figura 5 – Papel das fosfolipases A₂ secretórias do grupo IIA na aterogênese.*Matriz extracelular.



Fonte: Boyanovsky e Webb (2009).

Nem todos os efeitos mediados pelas sPLA₂s são decorrentes da sua atividade enzimática, principalmente em relação as sPLA₂s de venenos animais e das proteínas homólogas de sPLA₂s (ou cataliticamente inativas), como as Lys49 dos venenos animais e a sPLA₂ XIIB dos mamíferos. Até o momento, foram descobertos 2 receptores para sPLA₂, os receptores do tipo N e do tipo M. Os primeiros se ligam com altíssima afinidade as fosfolipases A₂ secretórias neurotóxicas, e os últimos as miotóxicas (na faixa de picomolar). O único receptor clonado é o tipo M, uma proteína de 180 kDa, que pertence a superfamília dos receptores de lectina tipo C, e são expressos em vários tecidos, principalmente em decorrência de estímulos inflamatórios (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; LAMBEAU, GELB, 2008)

A maioria das respostas mediadas por receptores permanecem controversas, com trabalhos mostrando principalmente o papel do receptor tipo M na inflamação (e choque séptico). Um fato interessante é que as sPLA₂s murinas se

ligam com relativa afinidade ao receptor tipo M (afinidade esta bem mais baixa que as das sPLA₂s de venenos), enquanto que as humanas, principalmente a GIIA se ligam com baixíssima afinidade a esse receptor! Trabalhos recentes mostram que as sPLA₂s GIIA se liga com alta afinidade às integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha 4\beta 1$, induzindo a proliferação de monócitos (SAEGUSA *et al.*, 2008 apud BOYANOVSKY; WEBB, 2009).

Ficou claro até aqui que ainda existe muito a ser investigado em relação as funções das sPLA₂s nos mamíferos, ao papel da atividade enzimática nas respostas induzidas por essas enzimas, mas principalmente em relação as propriedades de agir como ligantes que estas enzimas possuem. Devido as dificuldades inerentes de se pesquisar proteínas pouco expressas, as sPLA₂s de venenos podem ser importantes aliadas nesse caminho, como veremos em seguida.

2.1.4 Fosfolipases A₂ de venenos animais

Muitas das descobertas envolvendo o papel fisiopatológico das sPLA₂s ocorreram através do estudo das sPLA₂s presentes em venenos animais, principalmente devido a sua abundância, facilidade de isolamento e relativa estabilidade (BURKE; DENNIS, 2008; LAMBEAU; GELB, 2008; TOYAMA *et al.*, 2012). As sPLA₂s são os principais constituintes de diversos venenos de serpentes, e são alvo de extensas pesquisas científicas devido a sua vasta gama de efeitos biológicos e sua grande familiaridade com a estrutura e função catalítica das enzimas de mamíferos (COTRIM, 2011). Entretanto, em contraste com as enzimas de mamíferos, as sPLA₂s de venenos de serpentes apresentam toxicidade relativamente alta (COTRIM, 2011; KINI, 2003).

Dentre as sPLA₂s encontradas em venenos animais, as dos grupos IIA, V e X são as mais semelhantes as de mamíferos e relevantes para desenvolvimento de fármacos. Destas, as GIIA são, de longe, as mais estudadas (KANG *et al.*, 2011). Vários estudos mostram que as sPLA₂ GIIA de venenos quando administradas a animais de experimentação, induzem ou exacerbam respostas inflamatórias semelhantes as observadas com a administração de sPLA₂s de mamíferos (COTRIM *et al.*, 2011; DHARMAPPA *et al.*, 2009; TOYAMA *et al.*, 2009).

As sPLA₂s do grupo GIA são encontradas nos venenos de cobras (Elapidae), enquanto que as GIIA nos venenos de serpentes (Viperidae). As do GIII são encontradas nos venenos de abelhas associadas à outra proteína, a melitina (KINI, 2003; KUDO; MURAKAMI, 2002).

Dentre as sPLA₂s de venenos animais, as isoladas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* são as mais estudadas. Estas enzimas, com massa molecular em torno de 14 kDa e comprimento variando entre 119 e 134 aminoácidos, são proteínas básicas (pI entre 7,8 e 8,5,) que geralmente existem como dímeros (TOYAMA *et al.*, 1999, 2003). Duas α-hélices longas e antiparalelas, ligadas por pontes dissulfeto, formam um “canal hidrofóbico” que permite que o substrato chegue ao sítio ativo. Este é caracterizado por 4 resíduos principais: His48, Asp49, Tyr52 e Asp99. Como visto no item 2.1.2, a histidina se liga ao hidrogênio da molécula de água que participa da hidrólise enquanto o Asp49 coordena e posiciona o íon Ca²⁺, o qual se liga e polariza os grupamentos fosfato e a carbonila do ácido graxo durante a hidrólise (MONTECUCCO, GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008).

Dentre as atividades biológicas promovidas por essas enzimas estão a indução de edema, de distúrbios hemostáticos, a miotoxicidade e a neurotoxicidade (ZULIANI *et al.*, 2005). Estas últimas duas são de especial interesse na terapêutica dos envenenamentos por serpentes, pois podem desenvolver para quadros de desfiguração permanente (XIMENES, 2009). Além disso, os efeitos neurotóxicos e miotóxicos parecem advir tanto mecanismos dependentes quanto independentes da atividade catalítica, e sua compreensão pode ajudar a elucidar os mecanismos de ação destas enzimas (CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al.*, 2010; MONTECUCCO *et al.*, 2009, TEDESCO *et al.*, 2009).

Vários destes mecanismos são compartilhados, e diretamente dependentes de alguns fatores, como a distribuição das toxinas nos tecidos, capacidade de ligação a determinados tipos celulares e de causar dano a membrana celular. Estes fatores resultam no aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular, e no desencadeamento de eventos degenerativos, descritos a seguir.

Dois grupos de toxinas podem ser identificados em relação a sua distribuição no corpo do animal após a inoculação, as toxinas de ação sistêmica, que incluem as sPLA₂s neurotóxicas e as miotóxicas sistêmicas (como a crotovina), e as miotoxinas de ação local, que induzem apenas elevação moderada da creatina

quinase plasmática, sem causar mioglobinúria nem mionecrose sistêmica. O mecanismo de distribuição das toxinas sistêmicas não está esclarecido, mas as vantagens evolutivas são evidentes, uma vez que se acredita que as sPLA₂s de ação miotóxica se ligam rapidamente aos tecidos, evitando assim sua distribuição sistêmica (MONTECUCCO, GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008).

O primeiro passo, e essencial, para que as toxinas possam induzir neuro ou miotoxicidade é sua ligação às células alvo. Apesar de essencial, o mecanismo molecular deste fenômeno permanece desconhecido. A única neurotoxina com proteína receptora conhecida é a β -bungarotoxina, que se liga aos canais de K⁺ pré-sinápticos. Menos ainda se sabe a respeito dos receptores para sPLA₂s miotóxicas, apesar deles aparentemente serem expressos principalmente na superfície celular dos miotubos diferenciados e das células musculares adultas (MONTECUCCO, GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008; TEDESCO *et al.*, 2009).

a) Mecanismos de neurotoxicidade

Os venenos de muitas espécies de serpentes (principalmente das famílias Elapidae e Viperidae) possuem fosfolipases A₂ secretórias neurotóxicas. Estas enzimas se ligam a membrana de neurônios pré-sinápticos e hidrolisam fosfolipídios, causando um acúmulo progressivo de ácidos graxos e lisofosfolipídios. Em muitos casos, essas neurotoxinas têm participação importante nos envenenamentos por serpentes, causando uma paralisia flácida com sintomas autonômicos (como no envenenamento por cascaveis) (MONTECUCCO *et al.*, 2009; TEDESCO *et al.*, 2009).

O mecanismo preciso da neurotoxicidade induzida por estas sPLA₂s não está totalmente elucidado, mas ao que tudo indica está diretamente ligado a atividade catalítica destas toxinas, uma vez que a exposição de neurônios pré-sinápticos aos produtos de hidrólise das sPLA₂s (ácidos graxos e lisofosfolipídios) produz efeitos neurotóxicos muito parecidos aos causados pela exposição direta as sPLA₂s (MONTECUCCO *et al.*, 2009; TEDESCO *et al.*, 2009).

No entanto, este fenômeno não pode ser creditado exclusivamente a atividade catalítica das sPLA₂s. Várias evidências apontam a participação dos receptores do tipo N e de um influxo de Ca²⁺ aumentado. Este último evento pode

ser explicado pela formação de poros na membrana neuronal devido a hidrólise dos fosfolipídios pelas sPLA₂s (MONTECUCCO *et al.*, 2009; TEDESCO *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos também mostram que as sPLA₂s têm uma maior afinidade para as áreas de exocitose das vesículas sinápticas. Nessas áreas, o acúmulo de ácidos graxos e lisofosfolipídios desestabiliza a bicamada lipídica da membrana, causando a fusão das vesículas. Na microscopia eletrônica, as membranas aparecem com vários focos de invaginações onde as vesículas se fundiram. As mitocôndrias aparecem edemaciadas, devido ao aumento do Ca²⁺ intracelular ou a ação direta das sPLA₂s internalizadas (MONTECUCCO *et al.*, 2009; RIGONI *et al.*, 2004).

O aumento do Ca²⁺ intracelular leva a ativação de enzimas digestivas presentes nos lisossomos, como fosfolipases A₂ intracelulares e proteases, que amplificam o dano a maquinaria energética das células. Devido à disfunção mitocondrial, ocorre redução da produção ATP intracelular que leva a diminuição do funcionamento das bombas iônicas, causando edema celular e perda dos potenciais de ação (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009; MONTECUCCO *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2010; TEDESCO *et al.*, 2009).

b) Mecanismos de miotoxicidade

Muitos venenos de serpentes possuem sPLA₂s miotóxicas como seus principais componentes e determinantes das suas ações patogênicas, como observados nas serpentes do gênero *Bothrops* (principalmente *B. jararacussu* e *B. asper*). Estas proteínas danificam a membrana plasmática das células musculares, causando mionecrose, com extravasamento de creatina quinase, que leva a inflamação local (CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al.*, 2010).

Até o momento, sabe-se que a miotoxicidade promovida pelas sPLA₂s é mediada principalmente pela desestabilização da membrana do sarcolema, que leva a um aumento do Ca²⁺ intracelular (e os efeitos deletérios clássicos decorrentes disso), efluxo de K⁺ e ATP da célula para o meio extracelular, este último amplificando o dano celular através da ação em receptores purinérgicos. Neste cenário, as sPLA₂s cataliticamente ativas parecem atuar diretamente por hidrólise dos fosfolipídios de membranas causando a perda da permeabilidade seletiva de

membrana. Em relação aos homólogos Lys49 cataliticamente inativos, as evidências apontam para inserção dos dímeros (forma quaternária mais abundante em pH fisiológico) na membrana do sarcolema formando poros grandes o suficiente para entrada do Ca^{2+} e saída do K^+ e ATP (CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al.*, 2010).

Outro fator que contribui para a miotoxicidade, principalmente a localizada, é a ativação dos leucócitos pelas sPLA₂s miotóxicas (e pelas produtos intracelulares extravasados das células necróticas), que leva a um infiltrado inflamatório intenso na área afetada, com liberação de mediadores inflamatórios e citocinas que aumentam o dano às células musculares em degeneração (KANG *et al.*, 2011; MONTECUCCO, GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

*A conclusão que se pode tirar disto é que, independentemente da perturbação da membrana ser causada por miotoxinas ou neurotoxinas, o mecanismo patológico intracelular é o mesmo: um aumento da permeabilidade iônica com alteração do potencial de membrana, e o que aparenta ser o mais importante é o rápido aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico devido ao influxo a partir do meio extracelular (MONTECUCCO *et al.*, 2009; MONTECUCCO, GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008; TEDESCO *et al.*, 2009).*

2.2 Inibidores de fosfolipases A₂ secretórias

As sPLA₂s são enzimas pró-inflamatórias e sua possível inibição tem sido considerada como uma alternativa terapêutica. No entanto, as várias tentativas de desenvolver inibidores de sPLA₂s para o tratamento de doenças inflamatórias e envenenamentos não tiveram êxito, principalmente devido a diversidade estrutural das sPLA₂s, e do papel dual que algumas delas apresentam, participando da homeostasia e até mesmo atuando como agentes anti-inflamatórios (YEDGAR; COHEN; SHOSEYOV, 2006; YEDGAR; LICHTENBERG; SCHNITZER, 2000).

O principal motivo de falha desses inibidores é a inibição não seletiva, principalmente das cPLA₂s e sPLA₂s, que pode ser tóxica devido a interferência com o metabolismo basal dos fosfolipídios. A inibição das sPLA₂s é preferível, uma vez que os níveis aumentados dessas enzimas estão associados a diversas condições patológicas (LAMBEAU; GELB, 2008; YEDGAR; COHEN; SHOSEYOV, 2006).

Contudo, a inibição seletiva de uma única isoforma parece não ser suficiente para atingir o efeito desejado, uma vez que vários testes com inibidores da sPLA₂ GIIA não mostraram resultados satisfatórios (BRADLEY *et al.*, 2005; BOWTON *et al.*, 2005; YEDGAR; LICHTENBERG; SCHNITZER, 2000; ZEIHNER *et al.*, 2005).

A inibição das sPLA₂s GIIA é, por motivos históricos, a mais estudada, porém, outras classes descobertas depois se apresentam como alvos interessantes. Um exemplo são as sPLA₂s GV, que são amplamente distribuídas nos tecidos humanos (principalmente no coração) e sua expressão é notadamente aumentada por estímulos inflamatórios. Além disso, a capacidade das sPLA₂s GV em hidrolisar fosfolípidios de membrana é bem maior que as sPLA₂s GIIA (YEDGAR; COHEN; SHOSEYOV, 2006).

A busca por inibidores de sPLA₂s tem sido intensa. Neste contexto, as sPLA₂s de venenos tem sido úteis como modelos de estudo para a triagem de inibidores de origem sintética ou natural – triagem esta muitas vezes realizada *in silico* (DA SILVA *et al.*, 2009; HAGE-MELIM *et al.*, 2009; NARGOTRA *et al.*, 2011) – que depois são testados *in vitro* utilizando enzimas humanas (BOYANOVSKY; WEBB, 2009; LAMBEAU; GELB, 2008; YEDGAR; COHEN; SHOSEYOV, 2006; YEDGAR; LICHTENBERG; SCHNITZER, 2000).

2.2.1 Produtos naturais como inibidores de fosfolipases A₂ secretórias

Os constituintes polifenólicos, como os flavonoides, são amplamente distribuídos entre as angiospermas, presente em espécies que são normalmente consumidas na dieta incluindo vários grãos, legumes, frutas, azeite de oliva, vinho tinto e chás (GARCÍA-SALAS *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2006). Várias atividades biológicas tem sido descritas para esse grupo, incluindo a anti-inflamatória, sendo um dos mecanismos mais importantes para essa atividade, a inibição da produção de eicosanoides, tanto por inibição de PLA₂, quanto de ciclo-oxigenases e lipoxigenases (KIM *et al.*, 2008; VAN HOORN *et al.*, 2003).

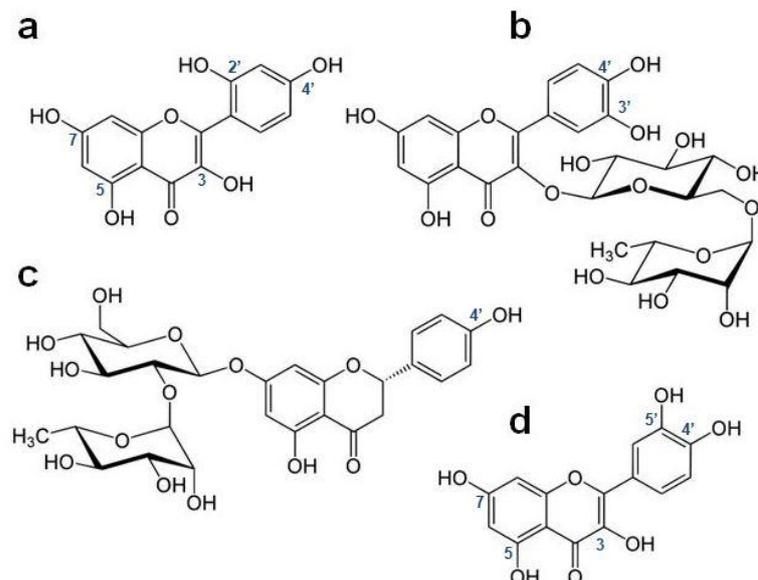
Os inibidores de sPLA₂s de origem natural conhecidos estão distribuídos em várias classes de metabólitos secundários de origem vegetal ou marinha, onde os flavonóides se destacam. Vários trabalhos demonstraram o efeito inibitório de

flavonoides como a quercetina, rutina, morina e naringina, e alguns poucos a inibição de sPLA₂s por isoflavonoides (CHIOU *et al.*, 2012; COTRIM *et al.*, 2011; DHARMAPPA *et al.*, 2010; IGLESIAS *et al.*, 2005; LINDAHL; TAGESSON, 1997, SANTOS *et al.*, 2011).

Alguns estudos demonstraram que o efeito inibitório dos flavonoides sobre as sPLA₂s estão relacionados a algumas características estruturais, como os grupamentos hidroxila nas posições 5, 3' e 4' (LINDAHL; TAGESSON, 1997). Até o momento, o que se sabe sobre o modo de ligação dos flavonoides nas sPLA₂s é que essa ligação é flexível e envolve a participação de resíduos hidrofóbicos das sPLA₂s (principalmente do canal hidrofóbico) e algumas interações hidrofílicas/eletrostáticas com resíduos estratégicos, como a His48 e com o íon Ca²⁺ (COTRIM *et al.*, 2011; LÄTTIG *et al.*, 2007).

Existem fortes evidências que os polifenóis dietéticos envolvidos no famoso “paradoxo francês” ajam em parte através da inibição de diferentes isoformas de sPLA₂s e LpPLA₂s (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997). Estas são as principais razões que tornam os flavonoides bons candidatos para estudos mais aprofundados de inibidores de sPLA₂s e que, por isso, motivaram estes Grupos de Pesquisa na realização de vários trabalhos (FIGURA 6).

Figura 6 – Flavonoides estudados pelo Grupo de Pesquisa em Bioquímica de Macromoléculas, coordenado pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama. **a.** morina, **b.** rutina, **c.** naringina, e **d.** quercetina.



Fonte: Autor.

2.2.2 *Harpalyce brasiliiana* Benth.

Harpalyce brasiliiana Benth. (Papilionoideae), conhecida como “raiz-de-cobra”, é uma planta de porte arbustivo, podendo medir até 4 metros de altura. É encontrada principalmente nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão, apresentando ramos alongados, folhas de coloração verde escura, aveludadas, estípulas pequenas, setáceas e caducas, com 7 a 11 folíolos, breve peciolados, oblongo elípticos de 2,5 a 3,5 cm de comprimento; flores alaranjadas; legume reto glabro de 5,0 a 7,5 cm de comprimento e 1,2 a 3,0 cm de largura (ARAÚJO, 2008).

Esta espécie, já era descrita como medicinal e utilizada na preparação de específicos (remédios para picadas de serpentes) em 1859, fato relatado na famosa obra *Flora Brasiliensis*, publicada pelo botânico Carl Friedrich Phillip von Martius na Alemanha, entre 1840 e 1906. Estudos etnobotânicos realizados por pesquisadores do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará (UFC) em várias regiões do Nordeste revelaram o uso das raízes desta espécie para tratar picadas de serpentes, e o uso de suas folhas para o tratamento de processos inflamatórios (informação verbal²).

Vários compostos foram isolados de extratos das raízes e folhas de *H. brasiliiana*. Nas raízes foram identificados diversos flavonóides (incluindo três pterocarpanos com atividade antiofídica comprovada, as cabenegrinas A-I e A-II e a harpalcina I), enquanto que das folhas foram isolados floroglucínóis e a isoflavona harpalcina 2 (ARAÚJO, 2008; DA SILVA et al., 2004; DA SILVA et al., 1999; XIMENES, 2009). A Figura 7 mostra um espécime de *H. brasiliiana* fotografado em seu habitat pelo Prof. Dr. Edilberto R. Silveira, do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará. A Figura 8 é uma litogravura extraída da coletânea de livros, *Flora Brasiliensis* do botânico alemão Carl F. P. Von Martius.

² Informações fornecidas pelo Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos, durante estudos no Horto de Plantas Medicinais de Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, em janeiro de 2008.

Figura 7 - Fotos de diferentes partes de *H. brasiliana*: (A) sementes, (B) flor, (C) raiz, (D) espécime completo em seu habitat.



Fonte: Araújo (2008).

2.2.3 Potencial terapêutico dos inibidores de fosfolipases A₂ secretórias

Os inibidores de sPLA₂s têm potencial terapêutico para o tratamento de várias patologias humanas nas quais as sPLA₂s estão envolvidas, como aterosclerose, câncer e as diversas doenças com componente inflamatório. Além disso, inibidores deste tipo seriam extremamente úteis como complemento no tratamento de vítimas de acidentes ofídicos (PITHAYANUKUL *et al.*, 2007; SAMY; GOPALAKRISHNAKONE; CHOW, 2012; TORRES *et al.*, 2011; YEDGAR; LICHTENBERG; SCHNITZER, 2000).

O efeito benéfico destes inibidores foi demonstrado em diversos modelos animais, contudo estes estudos falharam do ponto de vista clínico (BRADLEY *et al.*, 2005; BOWTON *et al.*, 2005; YEDGAR; LICHTENBERG; SCHNITZER, 2000; ZEIHNER *et al.*, 2005). Este é mais um fator estimulante no estudo dos flavonoides, uma vez que estas substâncias estão presentes em quantidades significativas na nossa dieta, um fato que depõe a favor da tolerabilidade e segurança de seu uso (TOYAMA *et al.*, 2012).

Em ratos, o uso de um inibidor sintético de sPLA₂ GIIA foi significativamente melhor que os tratamentos tradicionais a base de imunossuppressores e glicocorticoides em relação ao edema das articulações e os scores histopatológicos. Os autores sugerem a potencial aplicação clínica de inibidores de sPLA₂ GIIA como uma alternativa segura e mais eficaz do que a terapêutica anti-artrítica convencional (COULTHARD *et al.*, 2011).

Estudos utilizando camundongos *knockout* para ApoE (apolipoproteína E) demonstraram que a inibição da LpPLA₂ pelo darapladibe diminuiu a inflamação *in vivo* e a formação de placas ateroscleróticas nos animais, fortalecendo a idéia de uma terapia anti-aterogênica baseado no emprego de inibidores de LpPLA₂ (WANG *et al.*, 2011).

Em relação ao potencial terapêutico na complementação da soroterapia utilizada no tratamento das vítimas de envenenamentos por serpentes, as vantagens são evidentes. Primeiro porque o tratamento imunobiológico nem sempre está disponível fora dos grandes centros (onde a maioria dos acidentes ocorrem) devido às necessidades especiais de transporte/armazenamento e ao elevado custo

(PITHAYANUKUL *et al.*, 2007). Além disso, o tratamento tradicional é muito eficaz na estabilização do paciente devido à neutralização dos efeitos sistêmicos do envenenamento, mas possui eficácia limitada nas ações tóxicas locais, que são normalmente desfigurantes e podem deixar seqüelas permanentes nos pacientes (ESPINO-SOLIS *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009; LOMONTE *et al.*, 2009)

Outro motivo preocupante, principalmente em relação as sPLA₂s, é que estas toxinas são pouco imunogênicas, de forma que o soro anti-ofídico utilizado no tratamento das vítimas simplesmente não é capaz de neutralizar essas toxinas, além de produzirem efeitos de hipersensibilidade imediata (anafilaxia) (CARON *et al.*, 2009). Esses fatores quando levados em consideração como um todo, claramente demonstram o potencial dos inibidores de sPLA₂s como adjuvantes no tratamento de envenenamentos por serpentes (LOMONTE *et al.*, 2009; TOYAMA *et al.* 2012).

Em vista da ampla gama de possíveis aplicações dos inibidores de fosfolipases A₂ secretórias e dos indicativos etnobotânicos dos usos medicinais da Harpalyce brasiliana, é que os seguintes objetivos deste trabalho foram delineados, como relacionados na próxima seção.

Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade inibitória da harpalicina 2 sobre fosfolipases A₂ secretórias isoladas de venenos de animais.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade inibitória da harpalicina 2 sobre a atividade catalítica das fosfolipases A₂ secretórias isoladas dos venenos de *Bothrops pirajai*, *Crotalus durissus terrificus*, *Naja naja* e *Apis mellifera*;
- Estudar o bloqueio das atividades edematogênica e miotóxica das fosfolipases A₂ secretórias dos venenos de *Bothrops pirajai*, *Crotalus durissus terrificus*, *Naja naja* e *Apis mellifera* pela harpalicina 2;
- Determinar a IC₅₀ da harpalicina 2 sobre diversas enzimas pró-inflamatórias *in vitro*;
- Realizar estudos de modelagem molecular da harpalicina 2 utilizando como alvo as estruturas cristalográficas das fosfolipases A₂ disponíveis no *Protein Data Bank*;
- Comparar o efeito inibitório da harpalicina 2 e do brometo de *p*-bromofenacila sobre a atividade catalítica da fosfolipase A₂ do veneno de *B. pirajai*;
- Avaliar as alterações estruturais da fosfolipase A₂ do veneno de *B. pirajai* induzidas pelo tratamento com a harpalicina 2;
- Estudar o bloqueio da agregação plaquetária induzida pela fosfolipase A₂ do veneno de *B. pirajai* utilizando a harpalicina 2 e dois inibidores padrão de fosfolipases A₂, o ácido aristolóchico e o brometo de *p*-bromofenacila;

Material e Métodos

4. Material e métodos

4.1 Material

As sPLA₂s dos venenos de *Bothrops pirajai* e *Crotalus durissus terrificus* foram isoladas pelo Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama a partir de peçonhas liofilizadas obtidas do Bio-Agents Serpentarium, Batatais - SP, Brasil (TOYAMA *et al.*, 1999, 2003). A sPLA₂ do veneno de *Apis mellifera* foi adquirida da BIOMOL International (Nova Iorque, EUA), e as de *Naja naja* e de pâncreas bovino da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). As enzimas inflamatórias sPLA₂ grupo V (humana), COX-1 e COX-2 (ovinas), LOX 15hrc (humana recombinante), LOX 15syP1 (soja P1), LOX 5Pot (batata) foram compradas da Cayman Chemical (Michigan, EUA). Os outros sais e reagentes utilizados foram adquiridos de fornecedores credenciados com grau de pureza adequados a realização dos experimentos.

4.2 Material Botânico e Isolamento da Harpalicina 2

As folhas de *Harpalyce brasiliiana* Benth. foram coletadas pelo Prof. Dr. Edilberto R. Silveira na Chapada do Araripe, Barbalha – CE, Brasil. A identificação botânica foi feita pelo Prof. Dr. Edson P. Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). A exsicata foi depositada no Herbário Prisco Bezerra da UFC (nº 32.525).

As folhas de *H. brasiliiana* foram trituradas e extraídas com etanol a temperatura ambiente. O solvente foi removido sob aquecimento (60 °C) e pressão reduzida para obtenção do extrato etanólico (HBFE). Partições líquido-líquido de uma suspensão aquosa do HBFE (110 g) utilizando éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol originaram cinco frações após a evaporação do solvente ou liofilização: HBFEEp (24,5 g), HBFEC (22,4 g), HBFEA (6,8 g), HBFEB (30,4 g) e HBFEAq (21,2 g).

A fração clorofórmica (HBFEC, 12,0 g) foi submetida à cromatografia *flash*, utilizando n-hexano e acetato de etila como misturas binárias de polaridade crescente, rendendo 30 novas frações, que foram agrupadas em 9 frações depois de comparadas por cromatografia em camada delgada. A fração HBFEC (10 – 12)

apresentou um precipitado amarelo, que após recristalização em metanol, resultou em 120 mg de um sólido branco amorfo, com ponto de fusão (p.f.) entre 206,9 e 208,9 °C. Análises por espectrometria de massas (EM) e ressonância nuclear magnética (RNM) revelaram a estrutura da isoflavona harpalicina 2. As frações HBFEC (8 – 9) e (13 – 17) foram purificadas, usando o mesmo método, e renderam mais 200 mg de harpalicina 2 (HP-2). Estes procedimentos de obtenção dos extratos e de purificação da harpalicina 2 foram realizados pela Profa. Dra. Renata M. Araújo do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Para os ensaios bioquímicos e farmacológicos, a harpalicina 2 foi dissolvida em, no máximo, 1% de dimetilsulfóxido (DMSO).

4.3 Animais

Nos experimentos biológicos que se seguem foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 20 e 25 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN). Os animais foram mantidos sob condições padrão de umidade e temperatura, com ciclo claro-escuro de 12 horas, e água e comida *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as leis brasileiras que regulamentam a experimentação em animais. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC (nº 68/08).

Os métodos descritos a seguir foram agrupados na sequência que aparecem nos dois artigos publicados com os resultados desta tese, para melhor correlação com as seções Resultados e Discussão, não estando necessariamente em uma ordem cronológica de execução. Este primeiro artigo descreve o efeito antifosfolipásico A₂ da harpalicina 2 em diferentes sPLA₂s de venenos e de mamíferos, e serviu como uma triagem da atividade em estudo.

4.4 Avaliação geral da atividade antifosfolipásica A₂ da harpalicina 2

Estes métodos foram publicados no periódico *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (eCAM³) com o título “Inhibition of Neurotoxic Secretory Phospholipases A₂ Enzymatic, Edematogenic, and Myotoxic Activities by Harpalycin 2, an Isoflavone Isolated from *Harpalyce brasiliiana* Benth.”. O artigo original pode ser visto nos Apêndices (p. 115).

4.4.1 Atividade catalítica

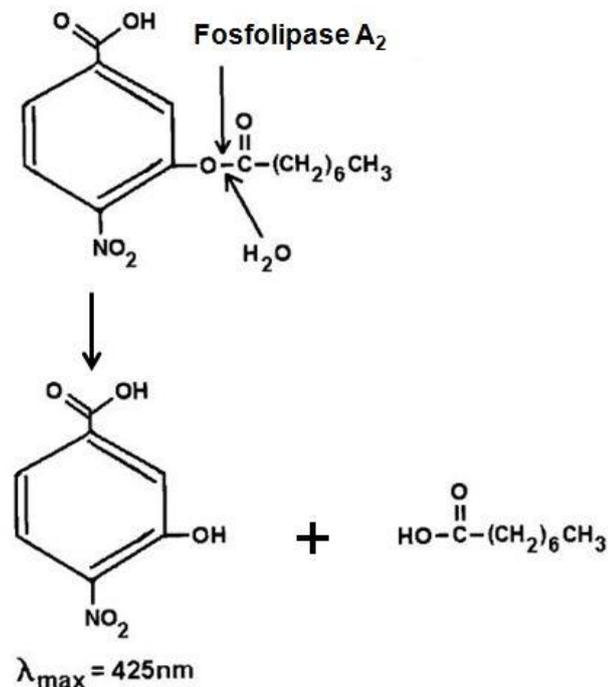
O efeito da harpalicina 2 na atividade catalítica de 4 sPLA₂s foi avaliado seguindo os protocolos descritos por Hernandez-Oliveira *et al.* (2005) e Toyama *et al.* (2009), utilizando as seguintes sPLA₂s:

- PrTX-III (piratoxina III), isolada do veneno de *B. pirajai*;
- Cdt F15, isolada do veneno de *C. d. terrificus*;
- Apis, isolada do veneno de *A. mellifera* (sem o componente melitina); e
- Naja, isolada do veneno de *Naja naja*.

A mistura reacional utilizada foi composta por 200 µL de tampão (10 mM de Tris-HCl, 10 mM de CaCl₂ e 100 mM de NaCl, pH 7,8), 20 µL do substrato sintético (ácido 4-nitro-3-octanoil-oxibenzóico, 4N3OBA, 1 mg/mL), 20 µL de água destilada e 20 µL da solução de sPLA₂ (1 mg/mL). A atividade enzimática foi calculada (n = 12) baseada no aumento da absorbância em 425 nm - após 20 minutos a 37 °C – como resultado direto da hidrólise do substrato sintético que resulta na liberação de um cromóforo (ácido 4-nitro-3-hidroxibenzoico) (FIGURA 9).

³ Fator de impacto calculado pela Thompson & Reuters de 4,774 (JCR 2011). Classificada no extrato A2 do comitê de Ciências Biológicas II da Capes.

Figura 9 – Estruturas do substrato sintético da sPLA₂, ácido 4-nitro-3-octanoil-oxibenzóico (4N3OBA), e do cromóforo, ácido 4-nitro-3-hidroxibenzoico, detectado em 425 nm.



Fonte: Petrovic *et al.* (2001).

Para avaliação o efeito da harpalicina 2 na atividade catalítica das fosfolipases A₂ secretórias, as sPLA₂ foram incubadas com a harpalicina 2 – na mesma proporção – por um período de 30 minutos. A concentração final da harpalicina 2 e do substrato sintético na mistura reacional foi a mesma, devido ao comportamento cinético das sPLA₂s, baseado em experimentos prévios realizados no Laboratório de Química de Macromoléculas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), coordenado pelo Prof. Marcos H. Toyama.

4.4.2 Indução de edema de pata

O edema foi induzido pela injeção subplantar de 25 μL da solução de sPLA₂s (1 mg/mL, ou seja, 25 μg /pata). O volume da pata do camundongo foi medido imediatamente antes da injeção das amostras e em diferentes intervalos de tempo após a injeção (30, 60, 120, 240 e 480 min) utilizando um pletismômetro (Ugo

Basile, Itália). Todas as amostras foram diluídas em tampão fosfato salina (PBS) estéril. Os resultados (n = 6) foram expressos como o aumento do volume da pata (em μL), calculados a partir da subtração do volume basal.

A capacidade de neutralização do edema de pata induzido pela administração das sPLA₂s anteriormente descritas foi testada de acordo com Iglesias *et al.* (2005). Para tanto, a harpalicina 2 foi incubada com as sPLA₂s – PrTX-III, Cdt F15, Apis e Naja – na mesma proporção (1:1; massa:massa) durante 30 min a 37 °C. Para apresentação dos resultados, os valores obtidos pela injeção de PBS e da HP-2 foram subtraídos dos valores dos grupos tratados – para melhor apresentação dos resultados – funcionando como controles negativos.

4.4.3 Miotoxicidade

A miotoxicidade induzida pela administração intramuscular das sPLA₂s – PrTX-III, Cdt F15, Apis e Naja – foi quantificada pela determinação da atividade plasmática da enzima creatina quinase (CK) utilizando o kit CK-UV (Sigma Chemical Co.). As sPLA₂s ou aquelas previamente incubadas com a harpalicina 2 – como descrito anteriormente – foram injetadas (25 μL) no músculo gastrocnêmio esquerdo dos camundongos (n = 6). Os grupos controle receberam PBS e HP-2. Após 3 horas da administração, amostras de sangue foram coletadas pela cauda dos animais, utilizando capilares heparinizados, e centrifugadas para separação do plasma. A atividade de CK foi determinada em triplicata utilizando 4 μL de plasma seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos em U/L.

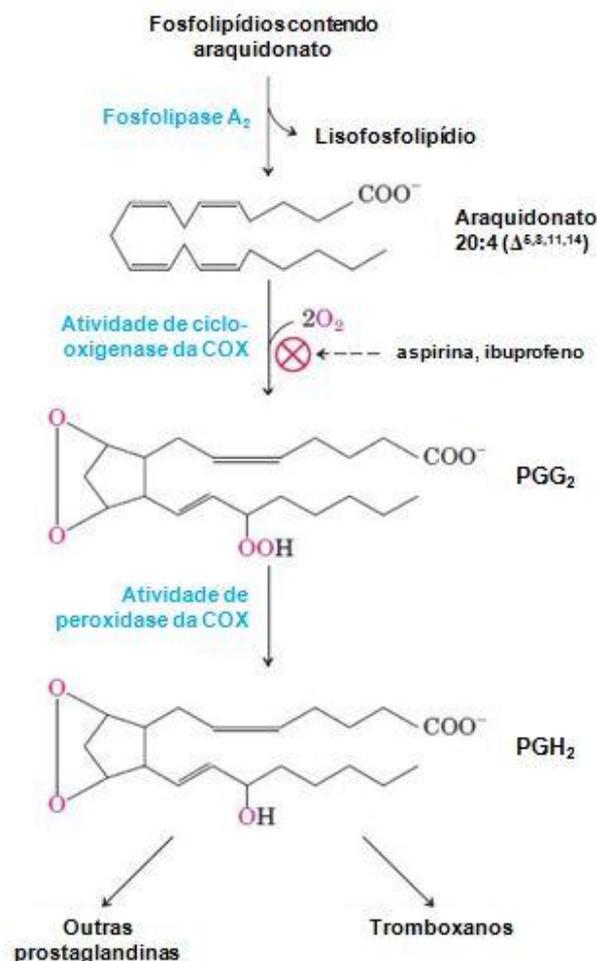
4.4.4 Atividade antiinflamatória in vitro

A capacidade de inibição de enzimas pró-inflamatórias pela harpalicina 2 em diferentes concentrações (4, 32, 64 e 128 $\mu\text{g/mL}$) foi testada utilizando diferentes enzimas de acordo com os protocolos estabelecidos pelos fabricantes, e descritos brevemente a seguir. Os valores de IC₅₀ foram calculados utilizando o programa GraphPad® Prism 5.0.

a) *Inibição das ciclo-oxigenases*

A ciclo-oxigenase (Prostaglandina H₂ Sintase ou PGHS) é uma enzima bifuncional que possui atividade de ciclo-oxigenase e de peroxidase. O componente COX converte araquidonato (AA) a um intermediário endoperóxido (prostaglandina G₂). Em seguida, o componente peroxidase reduz o grupamento endoperóxido a hidroxila correspondente (prostaglandina H₂), que é o precursor das prostaglandinas e tromboxanos (FIGURA 10).

Figura 10 - Cascata do ácido araquidônico para produção de prostaglandinas e tromboxanos.



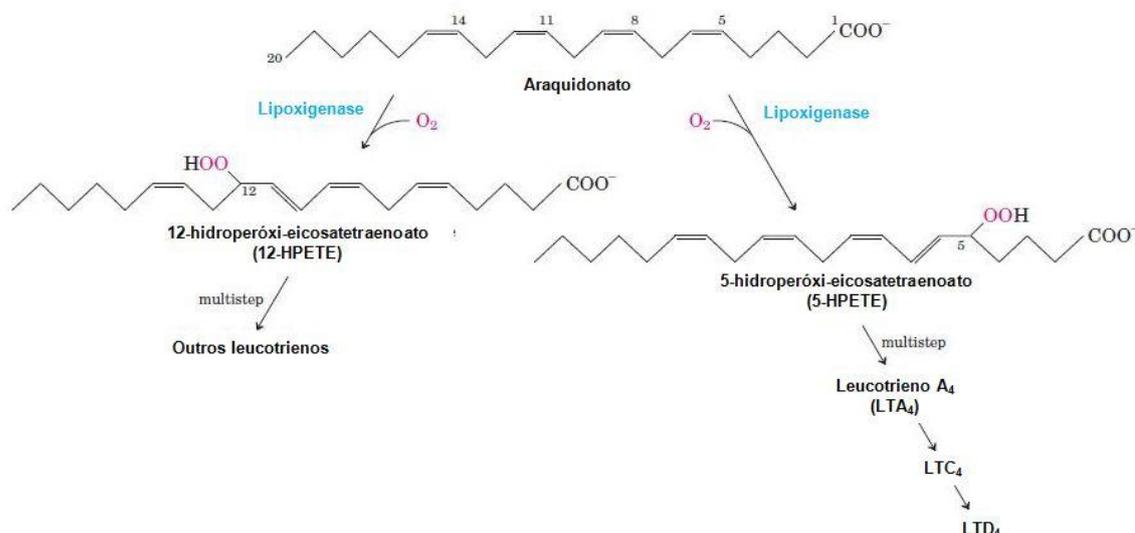
Fonte: Nelson e Cox (2004).

Os ensaios de inibição das COX-1 e 2 foram realizados pela quantificação da atividade de peroxidase da COX. A atividade peroxidase é medida colorimetricamente pelo monitoramento da oxidação do substrato colorimétrico (N,N,N',N'-tetrametil-*p*-fenilenodiamina, TMPD) em 590 nm. A mistura reacional foi composta de 150 μ L de tampão (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0), 10 μ L da solução de heme, 10 μ L da solução da enzima (COX-1 ou COX-2) e 10 μ L da solução de HP-2 (ou do solvente usado para diluição). Após leve homogeneização e incubação por 5 minutos a 25 °C, foram adicionados 20 μ L da solução de TMPD e 20 μ L de ácido araquidônico (1,1 mM em 5 mM de KOH) em cada poço. A leitura foi realizada em 590 nm – após mais 5 minutos de incubação a 25 °C – em leitor de placas SpectraMax 340 (Molecular Devices, EUA), em triplicata (n = 4).

b) Inibição das lipoxigenases

As lipoxigenases (LOX) são dioxigenases que catalisam a oxidação de ácidos graxos – que contenham ligações duplas conjugadas com estereoquímica *cis*, como o ácido araquidônico – pela adição de oxigênio molecular. A LOX incorpora um grupo hidroperóxi ao araquidonato - que pode ser introduzido nas posições C5, C12 e C15 – formando o hidroperoxieicosatetraenoato correspondente (5-, 12- ou 15-HEPTE). Este é o precursor direto do leucotrieno A₄ (FIGURA 11).

Figura 11 – Cascata do ácido araquidônico para produção de leucotrienos.

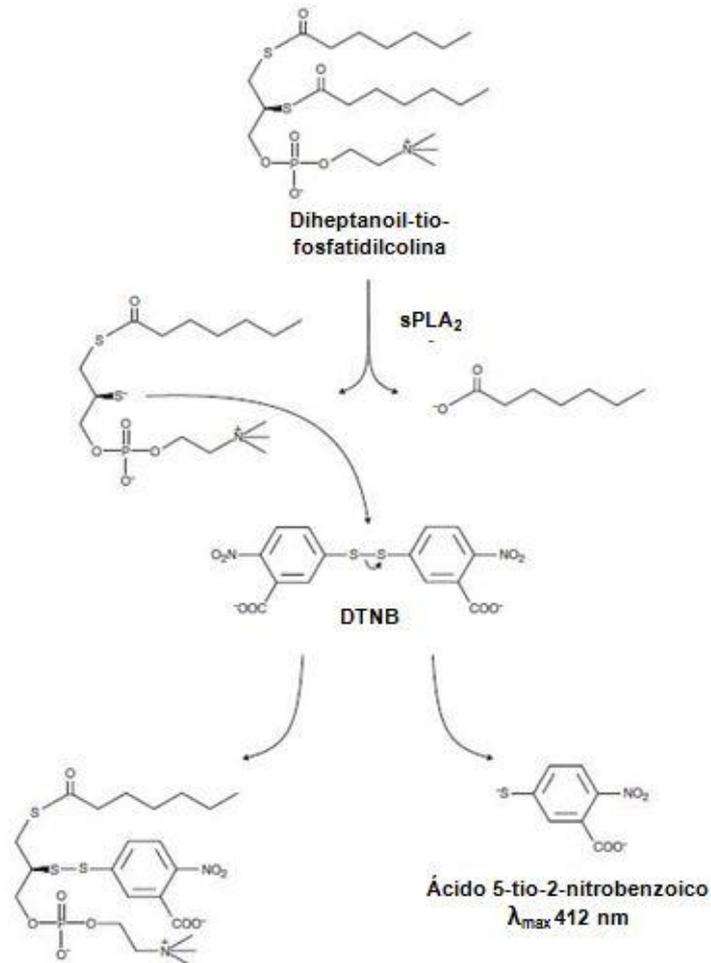


Os ensaios de inibição das 5- e 15-lipoxigenases foram baseados na produção de hidroperóxidos pela reação de lipoxigenação. As reações foram feitas em triplicata ($n = 4$). Para isso, foram adicionados 90 μL da solução de lipoxigenase e 10 μL da solução de harpalicina 2 (1 mg/mL, ou do solvente utilizado) em cada poço. A reação foi iniciada pela adição de 10 μL de AA 1 mM em cada poço, seguida pela agitação da placa por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de Chromogen[®] a cada poço. A placa foi mantida sob agitação por 5 minutos a temperatura ambiente para que a reação de cor entre os peróxidos formados e o Chromogen[®] ocorresse. A absorbância do produto formado foi medida em 490 nm utilizando um leitor de placas SpectraMax 340 (Molecular Devices, EUA).

c) Inibição das fosfolipases A_2 secretórias

A inibição das fosfolipases A_2 secretórias foi avaliada utilizando o 1,2-ditio-diheptonoil-fosfatidilcolina (DHTPC) como substrato e o ácido 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzoico) (DTNB, reagente de Ellman) como reagente de cor (FIGURA 12). As reações foram feitas em triplicata ($n = 12$). Foram adicionados 10 μL da solução de sPLA₂ e 10 μL da solução de harpalicina 2 (ou do solvente utilizado). Para iniciar a reação, 200 μL de DHTPC 1,66 mM em tampão Tris-HCl 25 mM, contendo CaCl₂ 10mM, KCl 100 mM e Triton X-100 0,3 mM (pH 7,5). A placa foi agitada por 30 segundos e incubada durante 15 minutos a 25 °C. Para a reação colorimétrica, foram adicionados 10 μL de DTNB 10 mM em tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 8,0). Após agitação, a absorbância foi medida em 405 nm utilizando um leitor de placas SpectraMax 340 (Molecular Devices, EUA).

Figura 12 – Esquema da reação para detecção de tióis livres utilizando o reagente de Ellman.



Fonte: Protocolo nº 10004883 da Cayman Chemicals (sPLA₂ Type V Inhibitor Screening Assay Kit).

4.4.5 Modelagem molecular

Para avaliar a interação entre a harpalicina 2 e os sítios ativos das quatro sPLA₂s de venenos foram utilizadas técnicas de modelagem molecular. Esses cálculos foram realizados no Laboratório de Química Teórica Medicinal (LQTM), do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, coordenado pelo Prof. Dr. Marcelo Zaldini Hernandez.

A estrutura da harpalcina 2 foi inicialmente otimizada pelo método AM1 (DEWAR *et al.*, 1985) implementado no programa BioMedCache (BIOMEDCACHE, 1989) com valores padrão para os critérios de convergência. Os cálculos de *docking* foram realizados no programa GOLD 4.0 (JONES *et al.*, 1997) para obtenção das afinidades relativas *in silico* da harpalcina 2 com os sítios ativos das sPLA₂s.

As estruturas tridimensionais das sPLA₂s foram obtidas no RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>), com os seguintes códigos de acesso:

- 1GMZ – Crystal structure of the D49 phospholipase A₂ Piratoxin III from *Bothrops pirajai*;
- 2QOG – Crotoxin B, the basic PLA₂ from *Crotalus durissus terrificus*;
- 1PSH – Crystal structure of phospholipase A₂ from Indian cobra reveals a trimeric association;
- 1POC – Crystal structure of bee-venom phospholipase A₂ in a complex with a transition-state analogue;

Os cálculos de *docking* foram conduzidos levando em consideração a flexibilidade da harpalcina 2, através da ativação dos graus de liberdade de rotação. O sítio ativo foi definido a partir de um raio de 10 Å do resíduo 48 (histidina ou ácido aspártico), devido à importância desse resíduo de acordo com a literatura (SCOTT, SIGLER, 1994; VERHEIJ *et al.*, 1980).

Com isso finalizamos os métodos utilizados no primeiro artigo. O segundo artigo, descrito a seguir, compara os efeitos da harpalcina 2 e de outros dois inibidores padrão de sPLA₂ – ácido aristolóchico e brometo de p-bromofenacila – na estrutura, atividade catalítica e agregação plaquetária induzida pela piratoxina III.

4.5 Caracterização do mecanismo de ação da harpalicina 2 na atividade enzimática e agregação plaquetária induzida pela piratoxina-III

Estes métodos foram publicados no periódico *BMC Complementary & Alternative Medicine*⁴ com o título “Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* venom”. O artigo original pode ser visto nos Apêndices (p. 124).

4.5.1 Atividade catalítica

Neste artigo, o efeito da harpalicina 2 e do brometo de *p*-bromofenacila (p-BPB) sobre a atividade catalítica da PrTX-III foi avaliado utilizando o substrato sintético 4N3OBA (TOYAMA *et al.*, 2003). A mistura reacional (descrita no item 4.4.1) foi incubada durante 40 minutos a 37 °C. A absorbância (em 425 nm) foi medida a cada 10 minutos. Para determinação da IC₅₀ da harpalicina 2 e do p-BPB, diferentes concentrações (5, 10, 20, 40 e 80 µg/mL) dos inibidores foram adicionadas.

4.5.2 Obtenção dos complexos PrTX-III:Harpalicina 2

O complexo PrTX-III:HP-2 foi obtido através de cromatografia líquida de fase reversa após pré-incubação (IGLESIAS *et al.*, 2005). A harpalicina 2 foi incubada numa proporção de 1:4 com a PrTX-III durante 60 minutos a 37 °C (250 µL de HP-2 e 1 mL de PrTX-III, ambas na concentração de 1 mg/mL). A PrTX-III foi diluída em bicarbonato de amônio 1 M.

Após a incubação, a solução foi centrifugada. Amostras de 200 µL do sobrenadante foram injetadas em uma coluna de fase reversa C5 (25 cm x 10 mm com 10 µm, Supelco, Pensilvânia, EUA) acoplada a um sistema de HPLC com monitoramento em 214 nm, de acordo com as seguintes condições:

⁴ Fator de impacto calculado pela Thompson & Reuters de 2,24 (JCR 2011). Classificada no extrato B1 do comitê de Ciências Biológicas II da Capes.

- Solução A – Ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em água;
- Solução B – Acetonitrila 66,6% na solução A;
- Gradiente:
 - 0 – 02 minutos: 100% solução A
 - 02 – 05 minutos: 80% solução A e 20% da solução B;
 - 05 – 30 minutos: 100% solução B
- Fluxo: 2,0 mL/min

O principal objetivo desta cromatografia foi separar o complexo PrTX-III:HP-2 da HP-2 que não havia complexado com a proteína. Os sais e contaminantes foram eluídos no início da cromatografia com 100% da solução A. O complexo PrTX-III:HP-2 foi utilizado nos ensaios de espectrometria de massas, dicroísmo circular, fluorescência intrínseca e agregação plaquetária, conforme descrito a seguir.

4.5.3 Cromatografia de exclusão molecular

As análises por cromatografia de exclusão molecular foram realizados segundo protocolo estabelecido por Oliveira *et al.* (2002). Para isso, foi utilizada uma coluna AP-1 (Waters, 1 x 60 cm) preenchida com Superdex 75 (Pharmacia, GE Healthcare), um gel filtrante de alta resolução para cromatografias analíticas e semipreparativas de biomoléculas com massa molecular entre 3 e 70 kDa. As proteínas (PrTX-III e PrTX-III:HP-2) (1 mg/mL) foram dissolvidas em 250 µL de tampão (fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,5), e centrifugadas a 4.500 g por 5 minutos. Amostras de 200 µL do sobrenadante foram incubadas a 37 °C durante 60 minutos antes da injeção na coluna. Foram injetados 25 µL de cada amostra, as quais foram eluídas sob condições isocráticas, com fluxo constante de 0,2 mL/min e monitoramento em 280 nm.

4.5.4 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica altamente eficaz para determinação do peso molecular de compostos através da formação de íons, com

separação e detecção baseada na relação massa/carga (m/z). Duas técnicas são utilizadas para determinação da massa de biomoléculas como proteínas e peptídeos: o *eletrospray* e a *matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight* (MALDI-TOF). Ambas as técnicas possibilitam que as amostras sejam levemente ionizadas, mantendo as moléculas relativamente intactas durante o processo de ionização (KICMAM; PARKIN; ILES, 2007).

A determinação da massa molecular da PrTX-III e da PrTX-III:HP-2 foi realizada por MALDI-TOF, utilizando um espectrômetro de massas Voyager-DE PRO MALDI-TOF (Applied Biosystems[®], Life Technologies[™], Califórnia, EUA). 1 μL das amostras (diluída em TFA 0,1%), foi misturada com 2 μL da matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, 50% de acetonitrila). A matriz foi preparada com acetonitrila 30% e TFA 0,1%. As seguintes configurações foram utilizadas no equipamento:

- Voltagem de aceleração: 25 kV;
- Laser fixo em: 2.890 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$;
- Delay: 300 ns;
- Modo de análise: linear

4.5.5 Dicroísmo circular

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica utilizada para avaliar a conformação e a estabilidade de proteínas em diferentes condições, como: temperatura, pH, presença de solutos e pequenas moléculas, especialmente ligantes. Dentre as vantagens acopladas a essa técnica estão a praticidade de uso, a necessidade de baixas concentrações das amostras (1 – 10 mg/mL) e o fato de ser uma técnica não destrutiva (CORRÊA; RAMOS, 2009).

Para apresentar bandas de CD, a molécula deve possuir pelo menos um centro quiral. No CD, um feixe de luz polarizado circularmente tanto à direita quanto à esquerda passa através da amostra, e a diferença entre a absorção dos componentes da esquerda e da direita é medida ($\Delta A = A_{\text{Esquerda}} - A_{\text{Direita}}$). Uma amostra opticamente ativa absorverá de maneira diferente a luz polarizada circularmente para esquerda e para direita, obedecendo à lei de Lambert-Beer (CORRÊA; RAMOS, 2009).

No estudo de proteínas, os resultados de são normalmente expressos como θ . A relação entre ΔA e θ pode ser explicada pela seguinte equação:

$$\theta = \Delta A/32.982$$

Normalmente θ é dado expresso em miligraus (m°) devido aos valores baixos das medidas de diversas amostras.

Para os ensaios de CD, as sPLA₂s – PrTX-III e PrTX-III:HP-2 – foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio (pH 7,4). A concentração final de proteína foi ajustada para 8,7 mM. Após centrifugação a 4.000 g por 5 minutos, as amostras foram transferidas para uma cubeta de quartzo, com caminho de luz de 1 mm. Os espectros de CD foram medidos em um intervalo de comprimento de onda de 185 – 300 nm em um espectropolarímetro J720 (Jasco[®], Tóquio, Japão), com fenda de 1 nm e tempo de resposta de 1 s. A coleta de dados foi realizada a temperatura ambiente, com velocidade de leitura de 100 nm/min. Nove leituras foram obtidas para cada amostra e todos os valores foram corrigidos pela subtração dos brancos do tampão.

4.5.6 Agregação plaquetária

A atividade de agregação plaquetária foi avaliada segundo os métodos publicados por Oliveira *et al.* (2008) e dos Santos *et al.* (2008). O sangue utilizado para os experimentos foi tirado de voluntários saudáveis, que negaram o consumo de qualquer medicamento no período de 15 dias anteriores a coleta. Este procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – sob o protocolo CAEE 0323.0.146.000-09 – onde os experimentos foram realizados.

O sangue foi coletado em tubos contendo 1/10 do volume final de citrato de sódio 3,8%. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido através de centrifugação do sangue total a 200 g, por 10 minutos a 20 °C. Para o preparo das plaquetas lavadas (PL), o PRP foi centrifugado a 2.000 g, por 12 minutos a 20 °C. O precipitado de plaquetas foi ressuspendido em 10 mL de solução tampão (NaCl 135 mM, NaHCO₃ 12 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 0,3 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM,

glicose 5 mM e albumina bovina 0,3%), e submetido a outra centrifugação e ressuspensão. A contagem das plaquetas foi realizada em um Coulter S Plus (Coulter Electronics, Florida, EUA) e a concentração final da suspensão de plaquetas foi ajustada para 300.000 plaquetas/mL e mantidas a temperatura ambiente durante 1 hora para recuperar a sensibilidade aos agentes agregantes.

A quantificação da agregação foi realizada utilizando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments Inc., Nova Iorque, EUA). A solução de plaquetas (0% de agregação) foi utilizada para determinar o 0% de transmitância, enquanto que a solução de plaquetas adicionada de trombina 0,05 UI/mL (100% agregação) foi utilizada para determinar a amplitude (100% de transmitância) do registro de agregação do plasma.

A atividade agregante da PrTX-III e o efeito dos inibidores – harpalicina 2 (HP-2), ácido aristolóchico (Aris Ac) e brometo de *p*-bromofenacila (*p*-BPB) – foi avaliada. Os ensaios foram realizados utilizando 400 µL da solução de plaquetas em uma cubeta siliconizada, incubadas a 37 °C sob agitação constante. Após 3 minutos da adição de 10 µg de PrTX-III (ou PrTX-III:HP-2; PrTX-III:Aris Ac; PrTX-III:*p*-BPB), a agregação foi medida durante 5 – 10 minutos.

Na tentativa de determinar o mecanismo de ação da harpalicina 2, a solução de plaquetas foi incubada com 10 µL de HP-2 (5 mg/mL), araquidonil-trifluorometil-cetona (AACOCF₃, 1 mM) ou indometacina (INDO, 1 mM) durante 5 minutos antes da adição de 10 µL dos agentes indutores de agregação: PrTX-III (10 µg) ou ácido araquidônico (AA, 50 mM).

4.5.7 Modelagem molecular

Os cálculos de *docking* foram realizados para determinar a afinidade *in silico* dos inibidores – harpalicina 2, ácido aristolóchico e brometo de *p*-bromofenacila – pelo sítio ativo da piratoxina III (PrTX-III).

A estrutura dos inibidores foi inicialmente otimizada pelo método AM1 (DEWAR *et al.*, 1985) implementado no programa BioMedCache (BIOMEDCACHE, 1989) com valores padrão para os critérios de convergência. Os cálculos de *docking* foram realizados no programa GOLD 4.0 (JONES *et al.*, 1997) para obtenção das afinidades relativas *in silico* da harpalicina 2 com os sítios ativos das sPLA₂s.

A estrutura tridimensional da PrTX-III foi obtida no RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>), com os seguintes códigos de acesso:

- 1GMZ – Crystal structure of the D49 phospholipase A₂ Piratoxin III from *Bothrops pirajai*;

A estrutura era um dímero, de forma que a cadeia “A” foi escolhida para realização dos cálculos, os quais foram conduzidos levando em consideração a flexibilidade dos ligantes (inibidores) e do alvo, para simular o ajuste induzido gerado pela presença de um ligante no sítio ativo. Para isso, os resíduos Phe5, Ile9, Phe18, Tyr21, Val22, Tyr27, His47, Asp48, Lys60 e Phe96 foram configurados de tal maneira que as torções das cadeias laterais foram consideradas ativas durante os cálculos. O sítio ativo foi definido como todos os átomos em um raio de 8 Å do ligante co-cristalizado, álcool isopropílico.

4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (E.P.M.) e analisados por análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Dunnett, onde os vários grupos são comparados a um grupo controle. O intervalo de significância foi fixado em 5% ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa GraphPad[®] Prism 5.0.

Na próxima seção, os resultados oriundos da execução dos protocolos descritos aqui são apresentados. Para melhor compreensão, os resultados também foram agrupados de acordo com os dois artigos publicados.

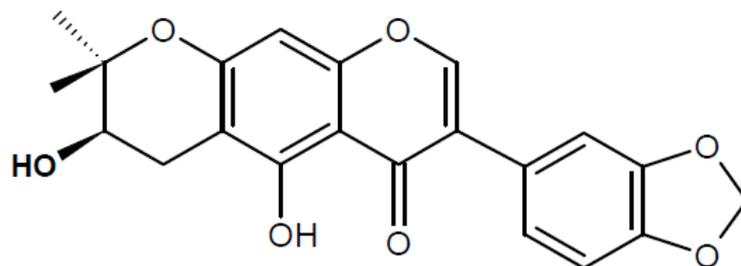
Resultados

5. Resultados

5.1 Avaliação geral da atividade antifosfolipásica A₂ da harpalicina 2

A harpalicina 2 foi isolada como um sólido amorfo com ponto de fusão entre 232,6 e 234,4 °C. Sua fórmula molecular de C₂₁H₁₈O₇ foi determinada pelo íon molecular em m/z 382 Daltons por espectrometria de massas. A elucidação estrutural foi realizada através de técnicas espectroscópicas, incluindo RMN 1D e 2D, e por comparação de dados da literatura, uma vez que o composto já havia sido isolado previamente (DA SILVA *et al.*, 1999). A estrutura da harpalicina 2 está representada na Figura 13.

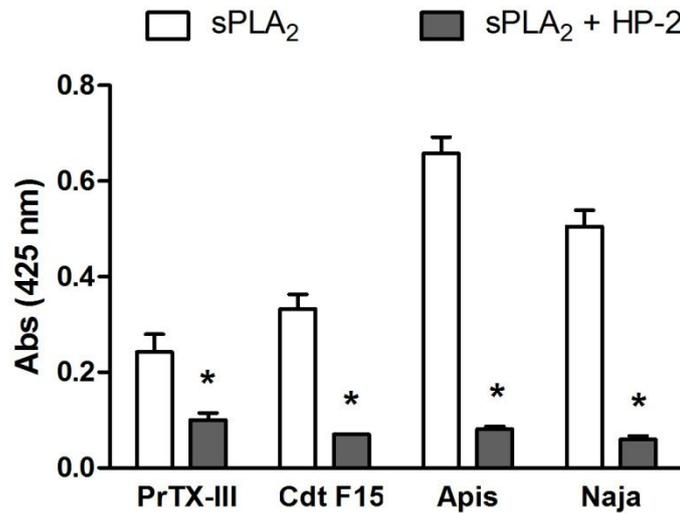
Figura 13 – Estrutura da harpalicina 2.



Fonte: da Silva *et al.* (1999).

O primeiro teste realizado com a harpalicina 2 – em relação a sua capacidade de inibir os efeitos das sPLA₂s – foi sobre a atividade catalítica de quatro sPLA₂s isoladas de venenos animais. A harpalicina 2 inibiu todas as sPLA₂s testadas (na proporção de 1:1 em relação ao substrato sintético utilizado). Os percentuais de inibição foi de 58,7 % para PrTX-III, 78,8% para Cdt F15, 87,7% para Apis e 88,1% para Naja (FIGURA 14). A título comparativo, estes percentuais de inibição foram bem maiores que os promovidos pelo brometo de p-bromofenacila, um inibidor de PLA₂ clássico (COTRIM *et al.*, 2011).

Figura 14 – Efeito da harpalicina 2 (HP-2) sobre a atividade catalítica das fosfolipases A₂ secretórias (sPLA₂) dos venenos de *Bothrops pirajai* (PrTX-III), *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15), *Apis mellifera* (Apis) e *Naja naja* (Naja) utilizando 4N3OBA como substrato e calculada através do aumento da absorbância (425 nm) após 20 min de reação. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com *p < 0,05.

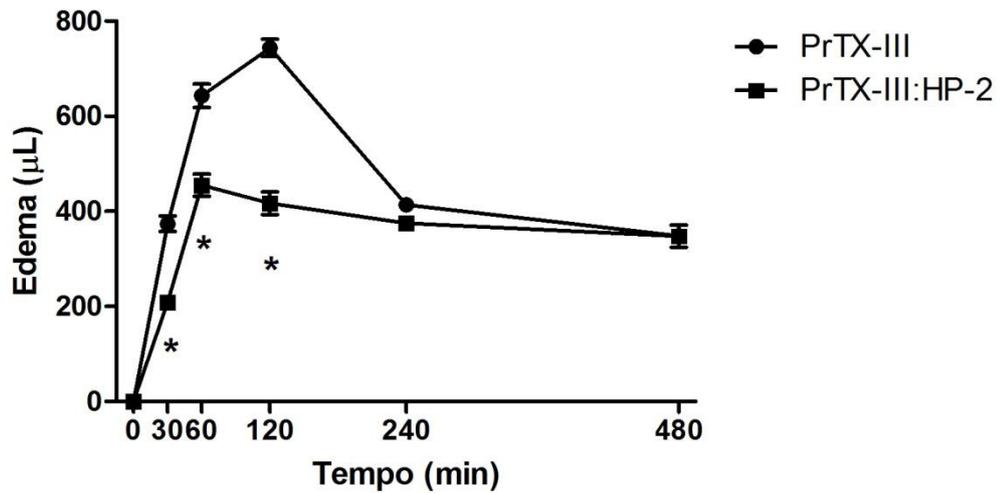


Fonte: Autor.

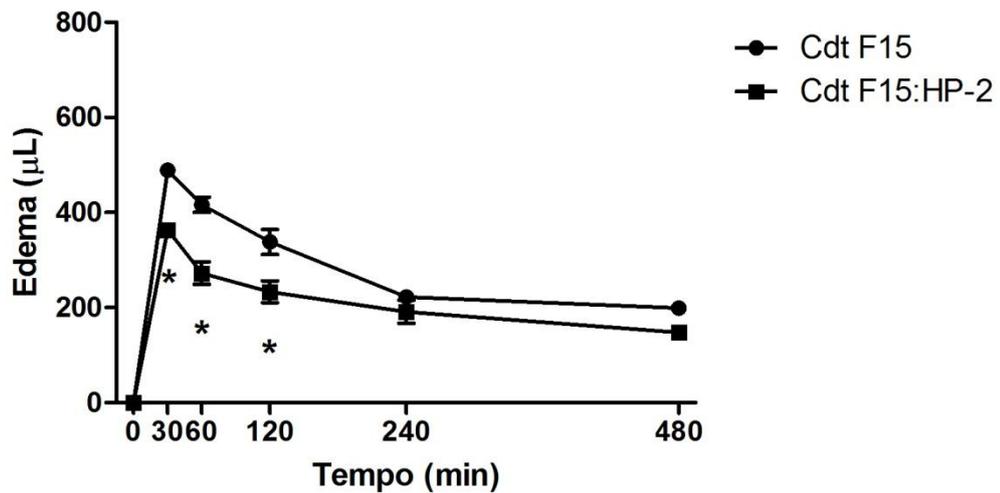
A harpalicina 2 neutralizou a primeira fase (pico) do edema de pata induzido pela administração exógena das sPLA₂s, não sendo eficaz na diminuição do platô mantido após 4 horas de administração das toxinas, como mostrado nas Figuras 15 e 16. Também foi observada inibição significativa da miotoxicidade induzida pelas sPLA₂s (FIGURA 17).

Figura 15 – Efeito da harpalcina 2 (HP-2) na formação do edema – medido em μL – após injeção subplantar das sPLA₂s (25 $\mu\text{g/pata}$) dos venenos de: **a.** *Bothrops pirajai* (PrTX-III), e **b.** *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com * $p < 0,05$.

a.



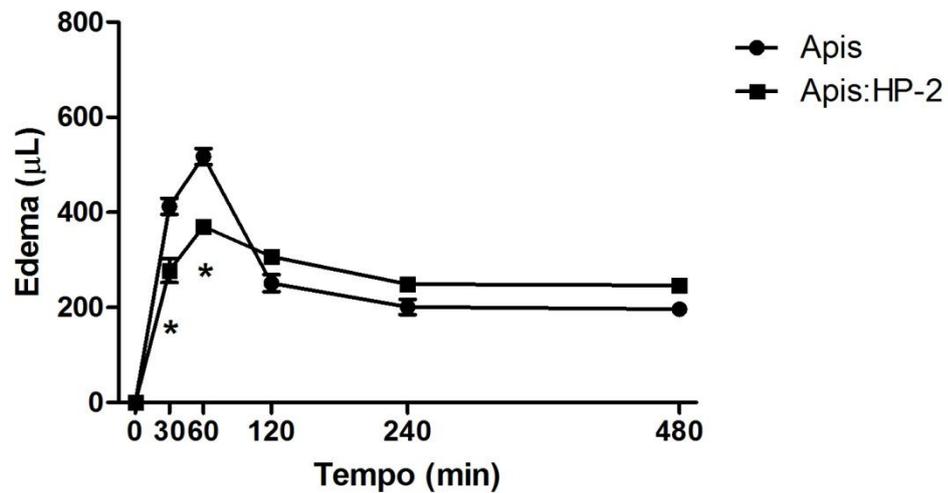
b.



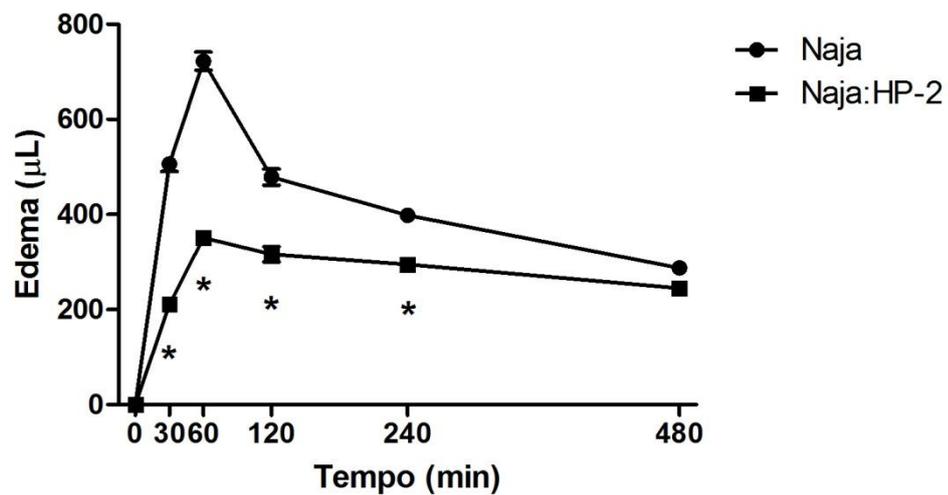
Fonte: Autor.

Figura 16 – Efeito da harpalcina 2 (HP-2) na formação do edema – medido em μL – após injeção subplantar das sPLA₂s (25 $\mu\text{g/pata}$) dos venenos de: **a.** *Apis mellifera* (Apis), e **b.** *Naja naja* (Naja). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com $*p < 0,05$

a.

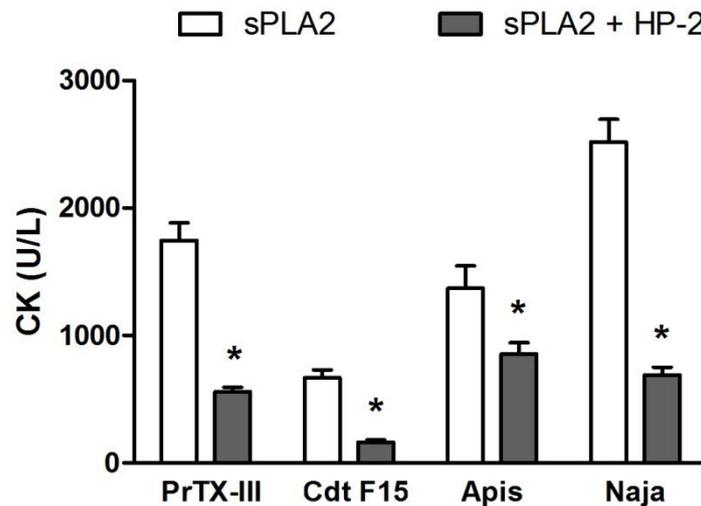


b.



Fonte: Autor.

Figura 17 – Inibição pela harpalcina 2 da miotoxicidade induzida pelas sPLA₂s (25 µg/animal) dos venenos de *Bothrops pirajai* (PrTX-III), *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15), *Apis mellifera* (Apis) e *Naja naja* (Naja) avaliada pela liberação de creatina quinase (CK) no plasma. Dados expressos como média ± E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com *p < 0,05.



Fonte: Autor.

Com o intuito de verificar se a harpalcina 2 também possuía atividade inibitória sobre outras enzimas pró-inflamatórias – o que caracterizaria uma possível atividade anti-inflamatória – foram realizados ensaios de inibição da atividade catalítica das ciclo-oxigenases-1 e -2, 5- e 15-lipoxigenases, além das fosfolipases A₂ secretórias de pâncreas e do grupo V. Os valores de IC₅₀ obtidos podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3 – Inibição da atividade catalítica de enzimas pró-inflamatórias pela harpalcina 2.

Enzimas Pró-Inflamatórias	IC ₅₀ (µg/mL)
sPLA ₂ pancreática (bovina)	11,90
sPLA ₂ grupo V (humana)	27,42
COX-1	131,90
COX-2	32,73
LOX 5 (batata)	ND
LOX 15 (humana)	55,96
LOX 15 (soja)	ND

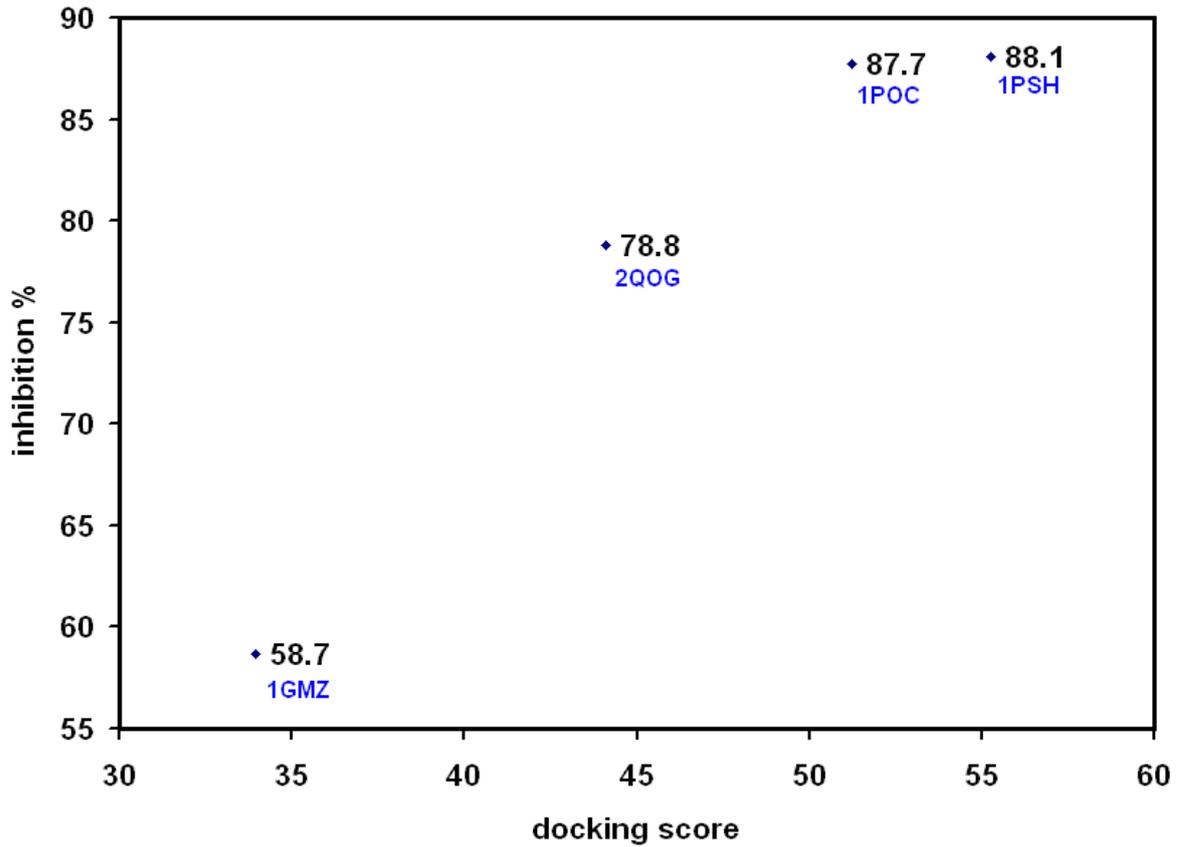
Nota: ND = Não determinado.

Fonte: Autor.

Para o melhor entendimento de como a harpalicina 2 interage com os sítios ativos das sPLA₂s testadas foram realizados cálculos de *docking* utilizando o programa GOLD 4.0. Os *scores* de *docking* (GOLD Scores) obtidos foram 33,93 para PrTX-III, 44,12 para Cdt F15, 51,23 para Apis e 55,26 para Naja. A partir destes valores, foi observada uma tendência interessante entre os resultados *in silico* (*scores* de *docking*) e os *in vitro* (percentuais de inibição da atividade catalítica) (FIGURA 18). A partir do alinhamento entre as sequências de aminoácidos das quatro sPLA₂s, utilizando o programa ClustalX (THOMPSON *et al.*, 1997), foi observado que Apis possuía uma sequência mais divergente (com apenas 24% de homologia quando comparada com a PrTX-III), enquanto que as outras três sequências eram similares (com valores de homologia de 44% para Naja e 57% para Cdt F15, quando comparadas com a PrTX-III) (FIGURA 19). Ao considerarmos as estruturas secundárias e terciárias, a diferença entre Apis e as outras três sPLA₂s foi maior, de forma que a estrutura de Apis não foi incluída no alinhamento estrutural realizado utilizando o programa PyMOL (DELANO, 2002), como mostrado na Figura 20.

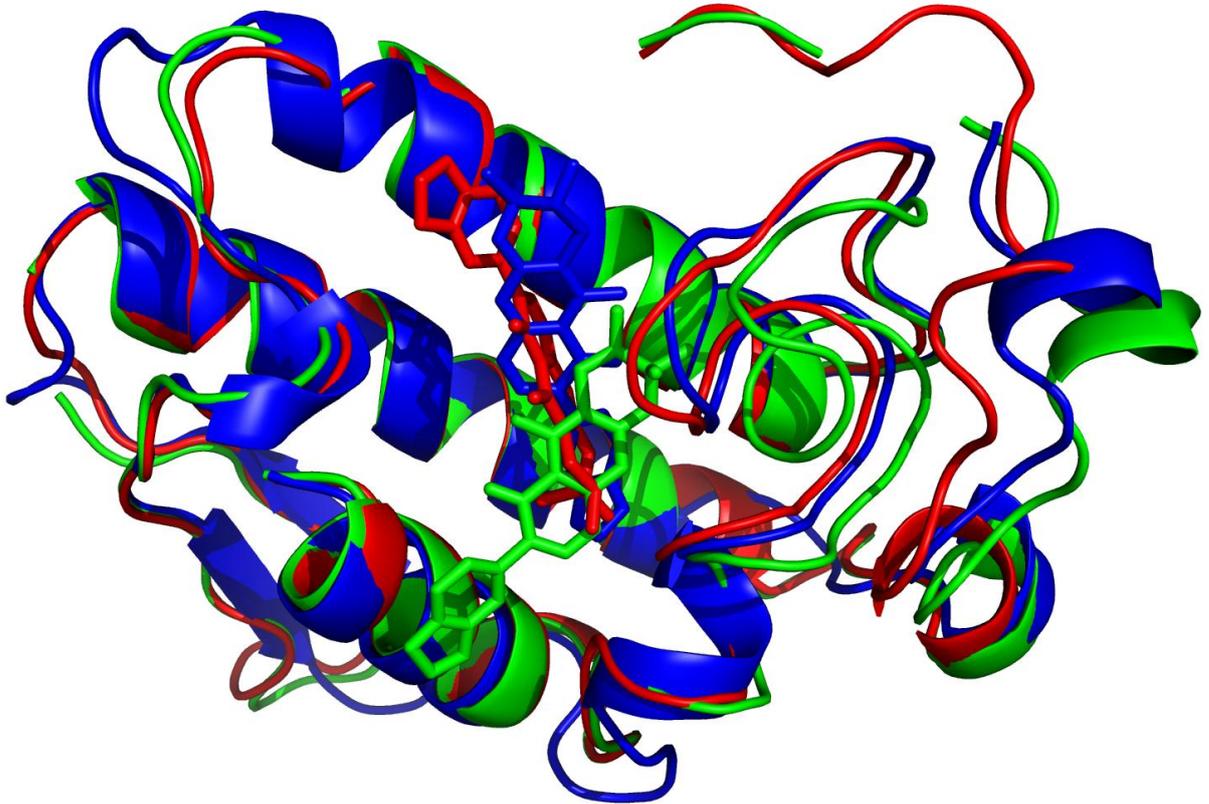
O melhor resultado de *docking* foi obtido utilizando o alvo 1PSH (Naja), corroborando o resultado *in vitro*, uma vez que a mesma sPLA₂ que apresentou o maior percentual de inibição da atividade catalítica. Por isso, esse resultado foi utilizado para mostrar detalhadamente as interações moleculares entre a harpalicina 2 e o sítio ativo da sPLA₂. Os resíduos mais importantes no sítio ativo, incluindo His48 e Asp49, foram evidenciados por estarem envolvidos em interações polares com a harpalicina 2 (FIGURA 21). Uma visão mais detalhada das interações intermoleculares esta representada na Figura 22.

Figura 18 – Tendência observada entre os resultados *in silico* (GOLD Scores) e os *in vitro* (percentuais de inibição da atividade catalítica). Os valores próximos aos pontos representam os percentuais de inibição e os códigos de acesso do PDB. Códigos de acesso do PDB: 1GMZ (PrTX-III), 2QOG (Cdt F15), 1PSH (Naja) e 1POC (Apis).



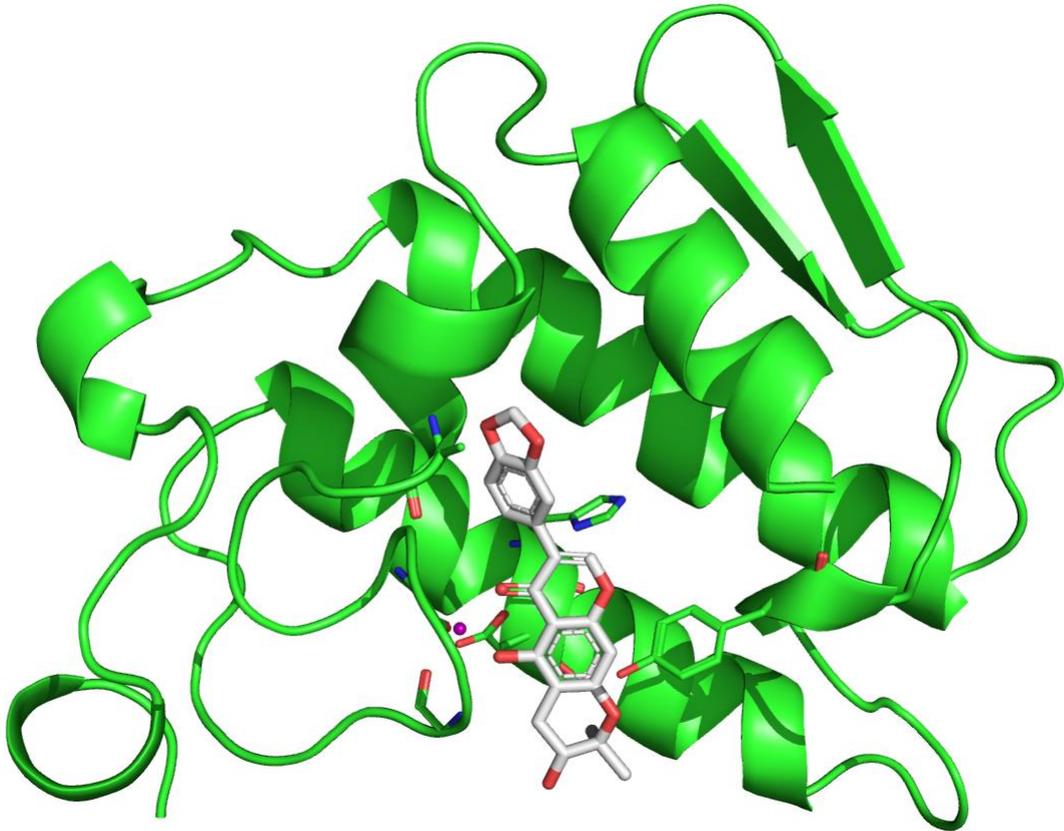
Fonte: LQTM.

Figura 20 – Alinhamento estrutural das sPLA₂s (cartoon) com seus respectivos resultados de docking para harpalcina 2 (stick): PrTX-III em verde, Cdt F15 em vermelho e Naja em azul. Modelo gerado utilizando o programa PyMOL (DELANO, 2002).



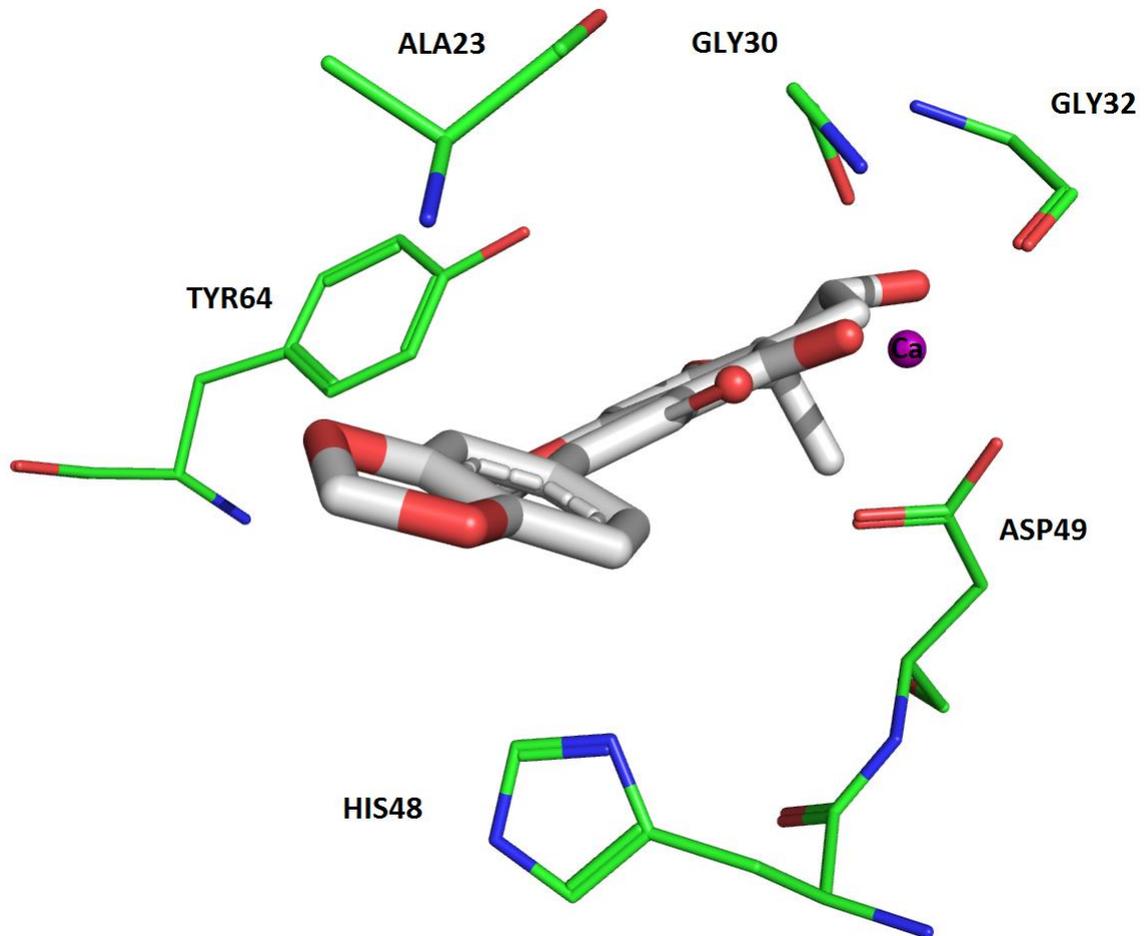
Fonte: LQTM.

Figura 21 – Visão panorâmica da melhor solução de *docking* obtida com o alvo 1PSH (Naja). Os resíduos importantes envolvidos em interação intermoleculares com a harpalcina 2 estão evidenciados. O íon Ca^{2+} presente no sítio catalítico também está representado (magenta).



Fonte: LQTM.

Figura 22 - Visão detalhada da melhor solução de *docking* obtida com o alvo 1PSH (Naja). Os resíduos importantes envolvidos em interação intermoleculares com a harpalicina 2 estão evidenciados. O íon Ca^{2+} presente no sítio catalítico também está representado (magenta).

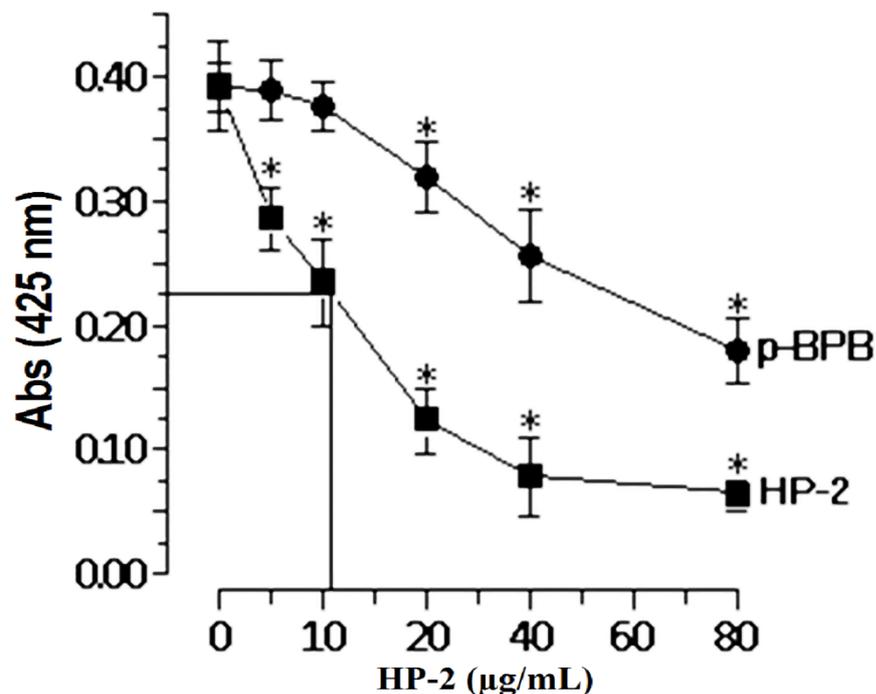


Fonte: LQTM.

5.2 Caracterização do mecanismo de ação da harpalicina 2 na atividade enzimática e agregação plaquetária induzida pela piratoxina-III

A harpalicina 2 demonstrou uma boa capacidade de inibição da atividade catalítica da PrTX-III em relação ao outro inibidor testado, o brometo de *p*-bromofenacila (*p*-BPB). A IC_{50} foi calculada utilizando o programa GraphPad® Prism em $11,34 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$. Não foi possível calcular a IC_{50} do *p*-BPB, pois o mesmo apresentou somente uma inibição parcial da PrTX-III nas concentrações testadas (FIGURA 23).

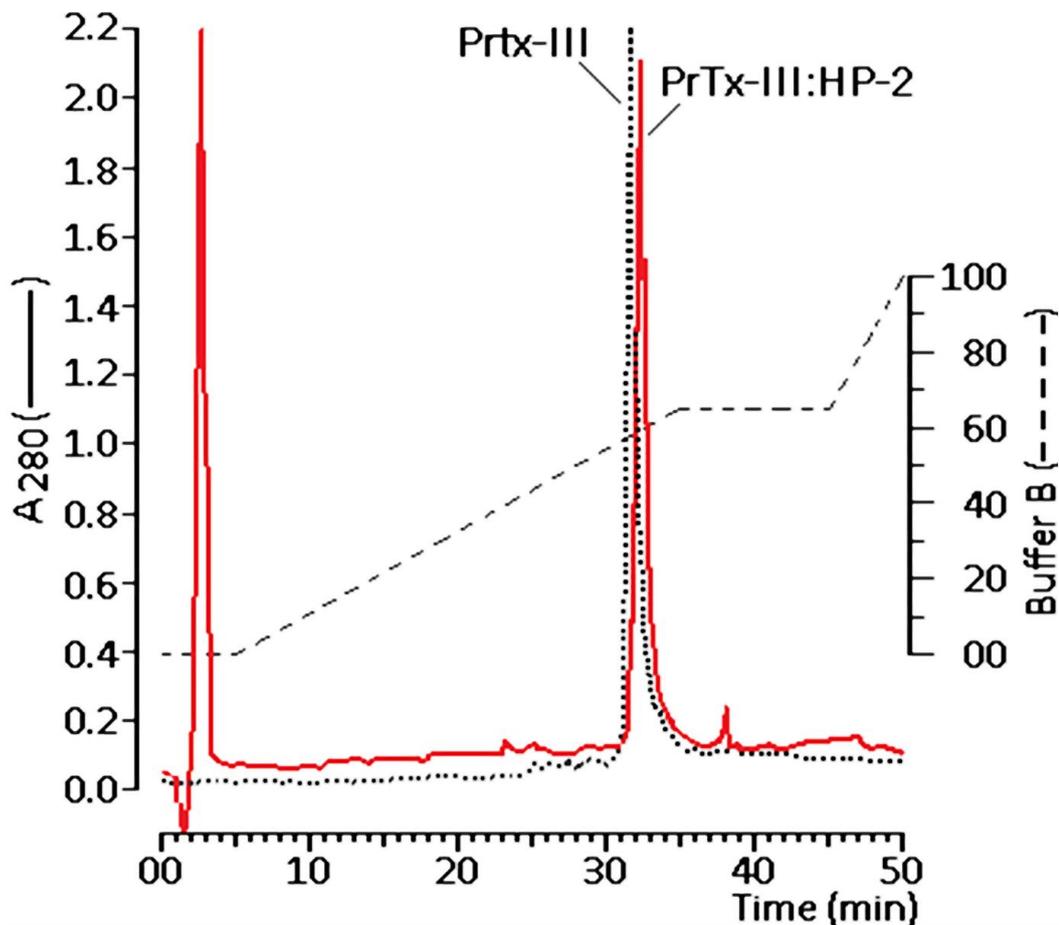
Figura 23 – Efeito inibitório há harpalicina 2 (HP-2) e do brometo de *p*-bromofenacila (*p*-BPB) sobre a atividade enzimática da PrTX-III, utilizando o ácido 4-nitro-3-octanoil-oxibenzoico (4N3OBA) como substrato para a reação enzimática. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com $*p < 0,05$.



Fonte: Autor.

Após a incubação da PrTX-III com a harpalicina 2 (4:1), foi realizada uma nova cromatografia em fase reversa, onde a PrTX-III não incubada (nativa) foi eluída em 31,7 minutos, enquanto a PrTX-III conjugada com a HP-2 (PrTX-III:HP-2) foi eluída aos 32,3 minutos, mostrando um pequeno aumento no tempo de retenção da proteína (FIGURA 24).

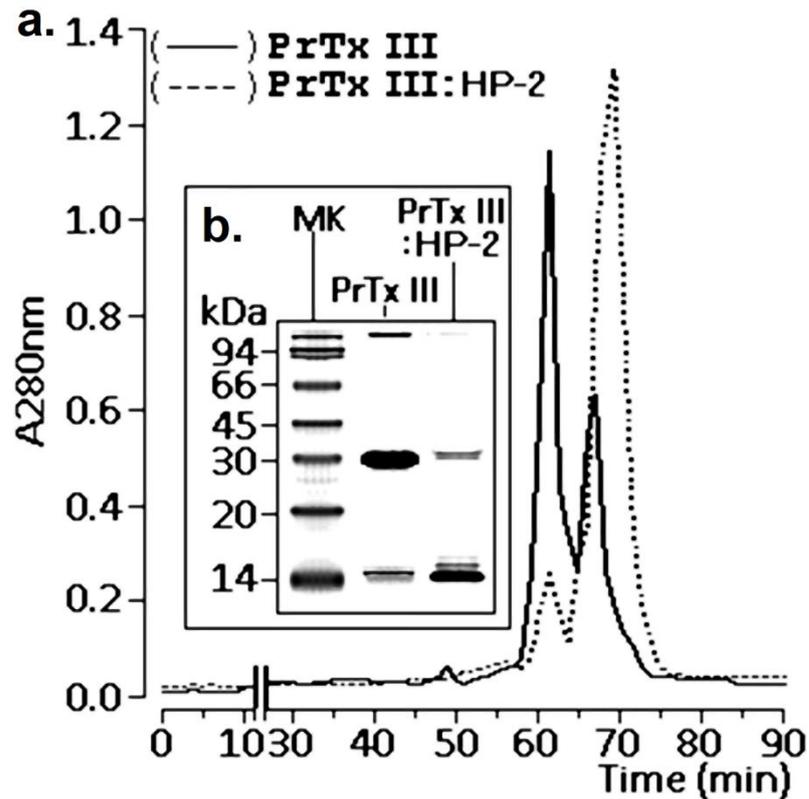
Figura 24 – Cromatograma em coluna de fase reversa da PrTX-III e da PrTX-III incubada com a harpalicina 2 (PrTX-III:HP-2), monitorado em 280 nm.



Fonte: Autor.

A análise por cromatografia de exclusão molecular revelou um fração principal com massa molecular estimada em 25 kDa e uma fração minoritária com massa molecular estimada em 14 kDa para a PrTX-III nativa. O comportamento oposto foi observado para a PrTX-III:HP-2, onde a fração com massa molecular estimada de 14 kDa representou aproximadamente 90% do total de proteína eluída. Este resultado mostra que o tratamento com HP-2 causou uma redução da dimerização da PrTX-III, enquanto que para PrTX-III nativa foi observada a transição típica de monômero para dímero (FIGURA 25a). Os resultados da cromatografia foram confirmados a partir de uma análise eletroforética (Tricine SDS-PAGE), como mostrado no detalhe (FIGURA 25b).

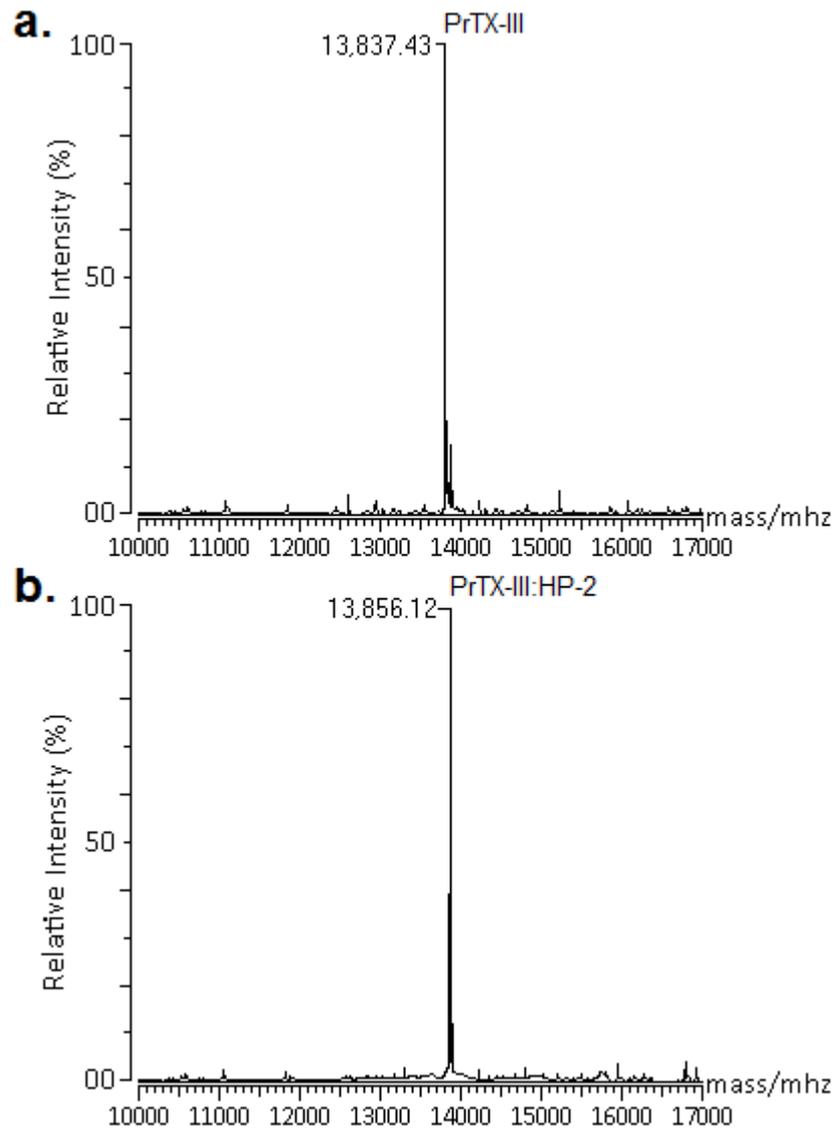
Figura 25 – Avaliação da dimerização. **a.** Cromatografia de exclusão molecular da PrTX-III e da PrTX-III tratada previamente com harpalicina 2 (PrTX-III:HP-2). As amostras foram submetidas às mesmas condições cromatográficas; **b.** análise por SDS-PAGE em tricina confirmando os resultados da cromatografia (MK, marcador molecular).



Fonte: Autor.

Após a confirmação da alteração na estrutura quaternária da PrTX-III pelo tratamento com a harpalicina 2, as amostras foram submetidas a espectrometria de massa (MALDI-TOF) com o intuito de verificar se a interação entre a PrTX-III e a HP-2 envolvia a formação de ligações químicas estáveis. Os resultados do MALDI-TOF revelaram valores de 13.837,43 Da para PrTX-III, e de 13.856,12 Da para PrTX-III:HP-2, sugerindo que a ligação entre a harpalicina 2 e a PrTX-III não envolveu a formação de um complexo estável (FIGURA 26). A discrepância entre os valores de massa molecular obtidos pode ser devida a restauração do íon H^+ em alguns aminoácidos.

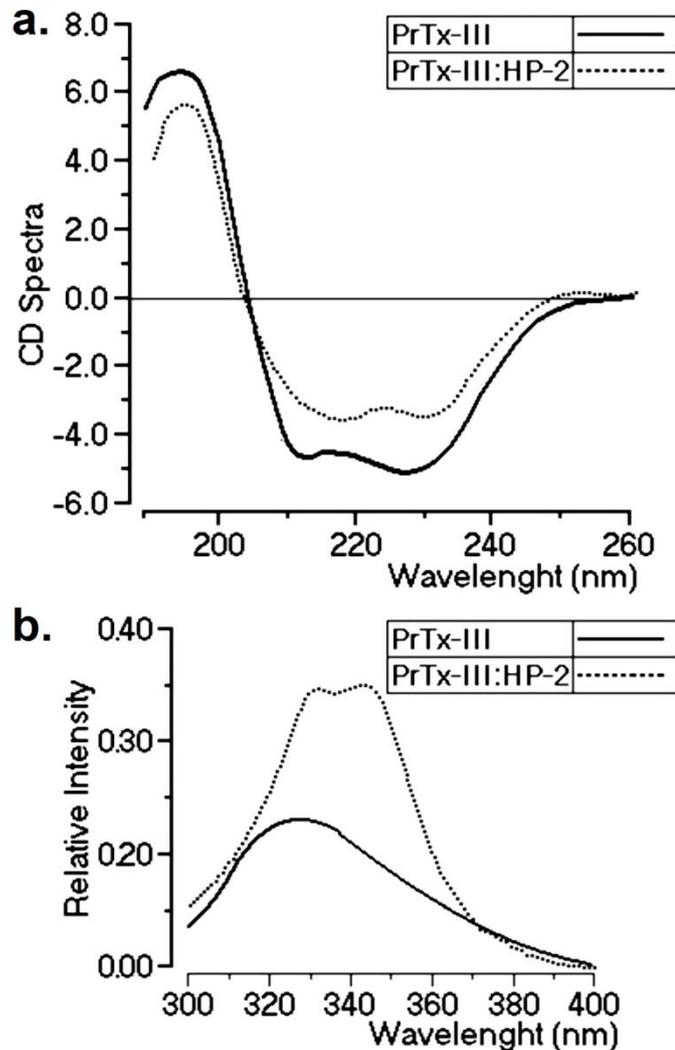
Figura 26 - Espectrometria de massa (MALDI-TOF) com voltagem de aceleração de 25 kV, laser fixo em 2.890 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, atraso de 300 ns e modo de análise linear. **a.** PrTX-III; **b.** PrTX-III:HP-2.



Fonte: Autor.

O espectro de dicroísmo circular (CD) da PrTX-III:HP-2 mostrou uma diminuição no total de alfa-hélices e de folhas-beta quando comparados com o espectro da PrTX-III nativa, sugerindo um desenovelamento parcial da proteína (FIGURA 27a). Esses dados foram reforçados pelo aumento observado na fluorescência do triptofano da sPLA₂ tratada com a harpalcina 2 (FIGURA 27b).

Figura 27 – Análises espectroscópicas. **a.** Espectro de dicroísmo circular da PrTX-III e da PrTX-III tratada com harpalicina 2 (PrTX-III:HP-2). Os dados obtidos na faixa de 185 – 260 nm estão representados e os resultados dos espectros expressos em m^o. **b.** Estão representadas as curvas de fluorescência da PrTX-III e da PrTX-III:HP-2.



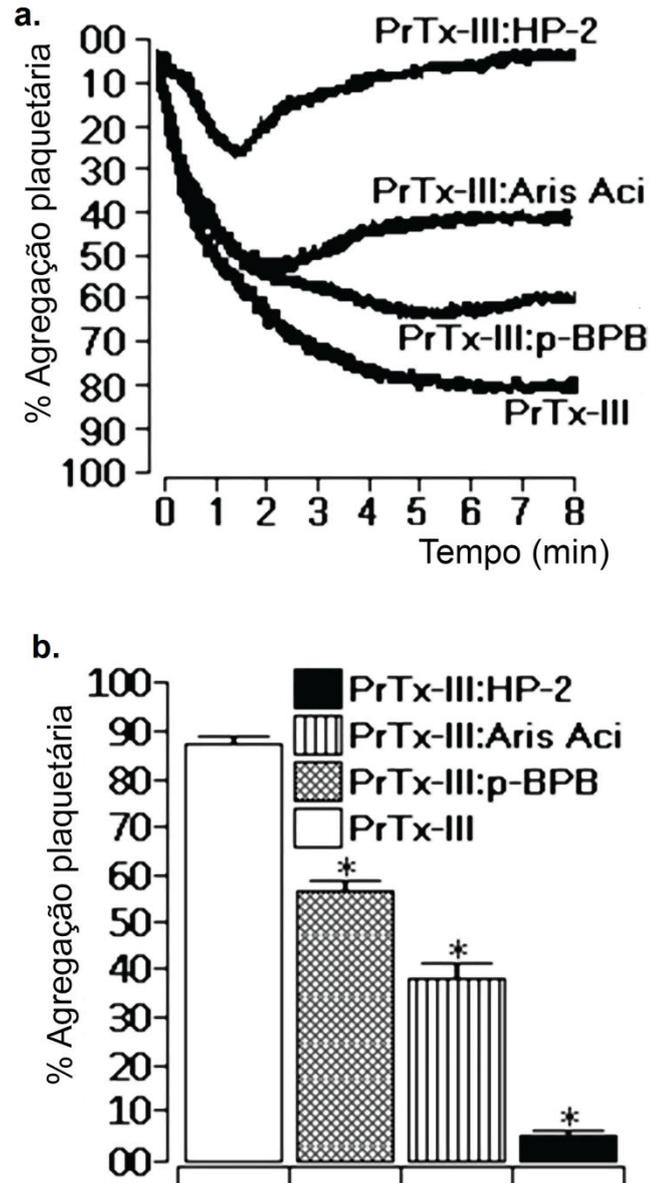
Fonte: Autor.

O efeito da harpalicina 2 sobre a agregação plaquetária induzida pela PrTX-III foi comparado ao de dois inibidores de sPLA₂s conhecidos, o ácido aristolóchico (Aris Ac) e o brometo de *p*-bromofenacila (*p*-BPB). Quando os inibidores foram pré-incubados com a PrTX-III e repurificados, os complexos sPLA₂-inibidor não tiveram a mesma resposta que a proteína nativa na indução da agregação plaquetária, a qual foi praticamente nula para o complexo PrTX-III:HP-2,

e parcialmente inibida para os complexos PrTX-III:Aris Ac e PrTX-III:p-BPB (FIGURA 28). Também foi observado que a PrTX-III tratada com a harpalicina 2 foi capaz de iniciar uma agregação de praticamente 20%, mas esta foi rapidamente revertida. Este efeito foi pouco evidente para o ácido aristolóchico e não foi observado com o p-BPB.

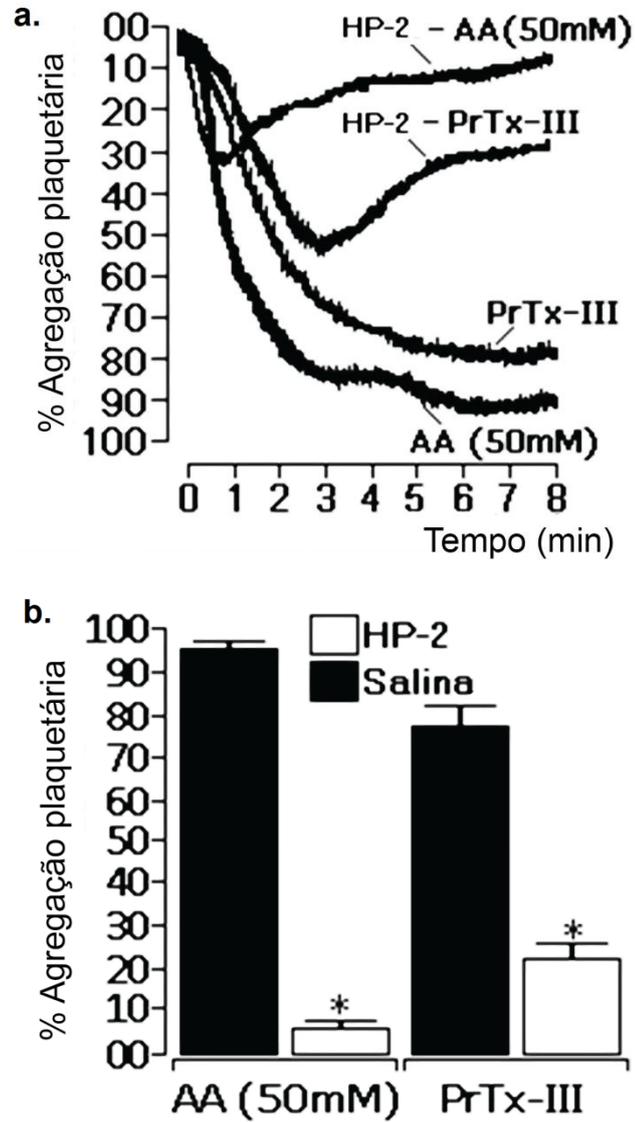
Quando a harpalicina 2 foi adicionada previamente a solução de plaquetas, tanto a agregação induzida pela PrTX-III, quanto àquela induzida pela adição de ácido araquidônico (50 mM) foi inibida (FIGURA 29). Este efeito foi semelhante ao observado com o uso do AACOCF₃ (araquidonil-trifluorometil-cetona), um inibidor específico de fosfolipase A₂, na indução da agregação pela PrTX-III. Em contraste, o tratamento prévio com indometacina só inibiu parcialmente a agregação induzida pela PrTX-III (FIGURA 30). Esse resultado aponta a atividade fosfolipásica A₂ como crucial na indução da agregação plaquetária completa (no intervalo de tempo do experimento), mas que a cascata do ácido araquidônico também está envolvida, uma vez que a harpalicina 2 também inibe a agregação induzida pelo ácido araquidônico.

Figura 28 – Agregação plaquetária induzida pela administração de 10 µg de PrTX-III ou de PrTX-III tratada com harpalicina 2 (HP-2), ácido aristolóchico (Aris Ac) ou brometo de p-bromofenacila (p-BPB). **a.** Curva temporal, e **b.** Agregação após 8 minutos. Dados expressos como média ± E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com * $p < 0,05$.



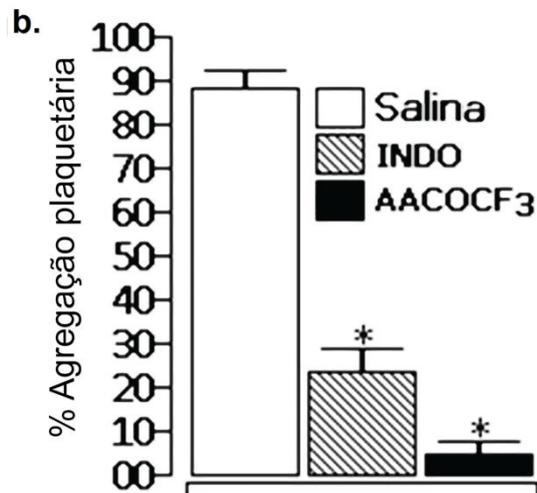
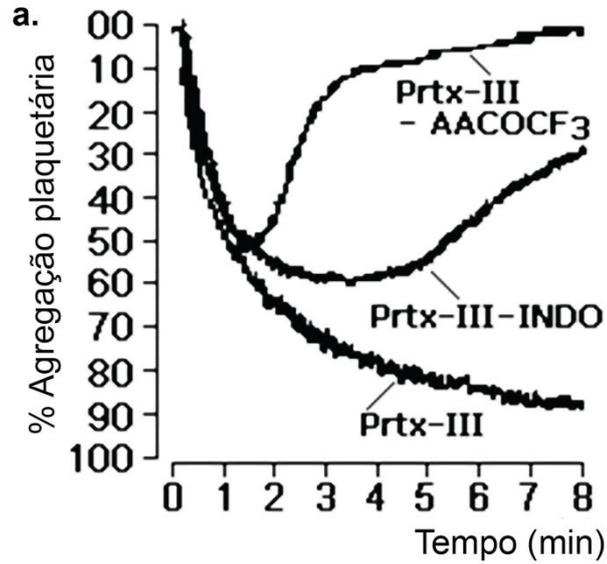
Fonte: Autor.

Figura 29 – Efeito da incubação das plaquetas com a harpalicina 2 (5 mg/mL) antes da administração de PrTx-III (10 µg) ou do ácido araquidônico (AA, 50 mM). **a.** Curva temporal, e **b.** Agregação após 8 minutos. Dados expressos como média ± E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com * $p < 0,05$.



Fonte: Autor.

Figura 30 – Efeito da incubação das plaquetas com AACOCF₃ (1 mM) ou indometacina (1 mM) antes da administração de PrTX-III (10 µg). **a.** Curva temporal, e **b.** Agregação após 8 minutos. Dados expressos como média ± E.P.M. e analisados por ANOVA com pós-teste de Dunnett, com *p < 0,05.



Fonte: Autor.

Os cálculos de *docking* foram realizados para determinar a afinidade relativa dos inibidores pelo sítio ativo da PrTX-III utilizando o programa GOLD 4.0. Os GOLD scores obtidos foram 36,78, 35,29 e 26,63 para a harpalicina 2, ácido aristolóchico e brometo de *p*-bromofenacila, respectivamente. A superposição das melhores soluções de *docking* para os três inibidores está representada na Figura 31, enquanto que uma visão detalhada do modo de ligação da harpalicina 2 ao sítio ativo da PrTX-III está mostrada na Figura 32.

A razão para maior estabilidade da harpalicina 2 no sítio ativo do alvo (maiores valores de GOLD score) é explicada principalmente pela presença de algumas interações intermoleculares, principalmente uma ligação de hidrogênio que a harpalicina 2 faz com o resíduo Asp48, com 2,88 Å (FIGURA 32). Uma comparação detalhada dos resultados de docking obtidos, com as interações intermoleculares, para os três inibidores e a PrTX-III está descrita na Tabela 4.

Figura 31 – Superposição das melhores soluções de docking para os inibidores harpalicina 2 (laranja), ácido aristolóchico (vermelho) e brometo de *p*-bromofenacila (verde). O álcool isopropílico cocrystalizado está representado em cinza.

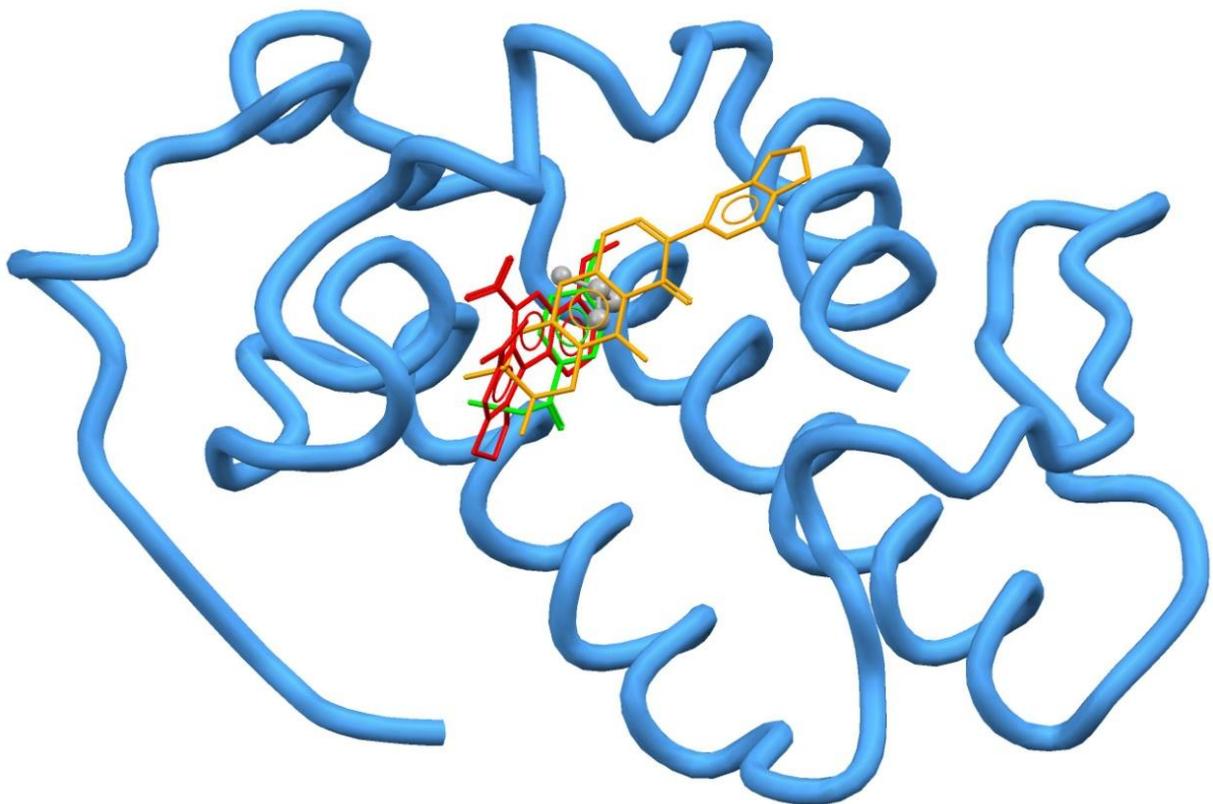
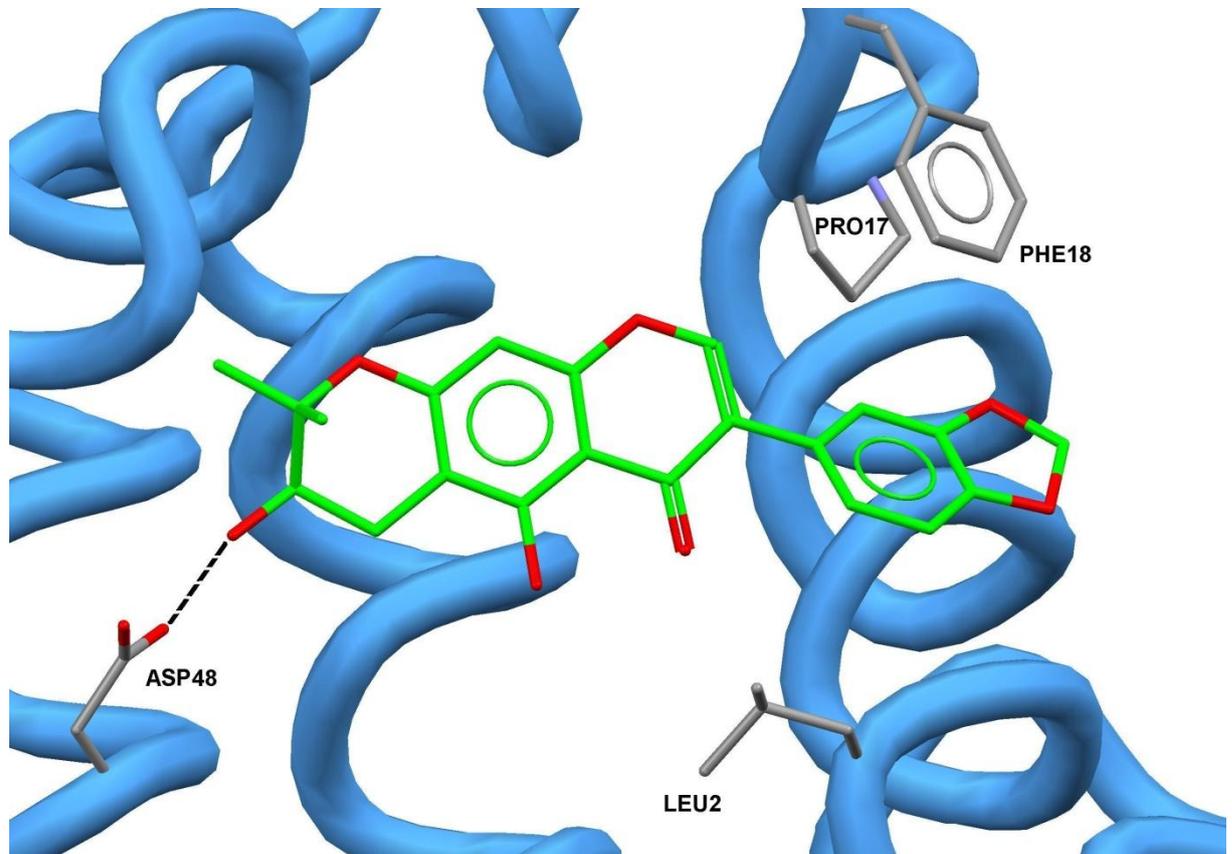


Figura 32 – Visão detalhada da melhor solução de docking para a harpalicina 2. A ligação de hidrogênio (com 2,88 Å) está representada pela linha preta (----).



Fonte: LQTM.

Tabela 4 – Detalhes dos resultados de *docking* e interações intermoleculares identificadas para os inibidores harpalicina 2 (HP-2), ácido aristolóchico (Aris Ac) e brometo de *p*-bromofenacila (p-BPB), utilizado como a PrTX-III (1GMZ) com alvo.

	HP-2		Aris Ac		p-BPB	
Inibição % da agregação plaquetária	95		55		35	
GOLD score	36,78		35,29		26,63	
Resíduos	HB	HP	HB	HP	HB	HP
Leu2	–	sim	–	–	–	–
Phe5	–	–	–	sim	–	sim
Ile9	–	–	–	sim	–	sim
Pro17	–	sim	–	sim	–	–
Phe8	–	sim	–	–	–	–
Tyr21	–	–	–	sim	–	sim
Aap48	2.88	–	–	–	–	–
Phe96	–	–	–	sim	–	sim

Nota: Os percentuais de inibição da agregação plaquetária foram incluídos para comparação. HB = ligações de hidrogênio, com valores dados em Å; HP = interações hidrofóbicas.

Fonte: LQTM.

Discussão

6. Discussão

Os produtos naturais de origem vegetal constituem uma importante fonte de substâncias potencialmente úteis no tratamento das mais variadas doenças. Essas substâncias são oriundas do metabolismo secundário das plantas, e exercem seus efeitos biológicos através da interação com macromoléculas, como proteínas (incluindo os receptores) e ácidos nucleicos (SIMÕES *et al.*, 2007).

Existe certa sobreposição entre a capacidade de algumas plantas, e/ou de seus constituintes ativos (isolados ou não), de neutralizar ações de venenos ofídicos e, das mesmas possuírem certo grau de atividade anti-inflamatória e/ou hepatoprotetora. Alguns exemplos que podem ser citados são *Eclipta alba* (L.) Hassk., *Curcuma longa* L. e *Aristolochia cymbifera* L., as três são antiofídicas comprovadas cientificamente, além de anti-inflamatórias e hepatoprotetoras usadas nas medicinas tradicionais de vários países a milênios!!! (LORENZI; MATOS, 2008; MELO; LÚCIA; HABERMEHL, 2007). Esta observação aponta a existência de alguma analogia entre os mecanismos relacionados com estas atividades (MORS *et al.*, 2000).

Algumas das possíveis explicações para essas ações sobrepostas são: (1) a resposta inflamatória do animal envenenado contribui para o quadro patológico do envenenamento, aumentando a lesão aos tecidos; (2) as enzimas/toxinas presentes nos venenos possuem similaridades estruturais com as enzimas pró-inflamatórias dos mamíferos, sendo assim inibidas pelas mesmas substâncias (LOMONTE *et al.*, 2009; MELO; LÚCIA; HABERMEHL, 2007; MORS, 1991, MORS *et al.*, 2000). Sabe-se que nenhuma das duas alternativas pode responder totalmente a questão.

Os flavonoides são compostos polifenólicos amplamente distribuídos nos vegetais, e devido aos seus efeitos sobre o sistema imune e a resposta inflamatória, são substâncias de grande interesse farmacológico. Além disso, vários trabalhos demonstraram que os flavonoides inibem as fosfolipases A₂ secretórias, a liberação do ácido araquidônico e a formação de seus metabólitos, os eicosanoides (GIL *et al.*, 1997; IGLESIAS *et al.*, 2005; LINDAHL; TAGESSON, 1997). Mais especificamente para as isoflavonas, já foram relatadas a inibição das sPLA₂s e das ciclo-oxigenases 1 e 2 (DHARMAPPA *et al.*, 2010; YANKEP *et al.*, 2003).

A harpalicina 2, uma isoflavona isolada das folhas de *Harpalyce brasiliiana*, foi testada quanto a capacidade de inibir as atividades enzimática e tóxicas de diferentes sPLA₂s isoladas de venenos animais. Primeiramente, os efeitos da harpalicina 2 foram testados sobre quatro sPLA₂s: PrTX-III, Cdt F15, Naja e Apis. Quando pré-incubada com as enzimas, a isoflavona inibiu a atividade catalítica das mesmas sobre o substrato sintético (4N3OBA), como pode ser observado na Figura 14.

A literatura relata uma inibição de aproximadamente 40% da atividade catalítica (nestas mesmas condições experimentais) das sPLA₂s de venenos pelo brometo de p-bromofenacila, um inibidor de sPLA₂s não específico amplamente utilizando como controle positivo nestes testes (COTRIM *et al.*, 2011; ZULIANI *et al.*, 2005).

Como a harpalicina 2 foi capaz de inibir a capacidade hidrolítica de todas as sPLA₂s testadas, seu efeito foi testado também sobre ações tóxicas mais específicas destas enzimas, como a ação edematogênica e miotóxica. Essas ações são comuns as sPLA₂s de venenos, enquanto que as enzimas de mamíferos possuem ação edematogênica menor e praticamente nenhuma ação miotóxica (KANG *et al.*, 2011).

Em relação à atividade edematogênica das sPLA₂s, a harpalicina 2 inibiu a primeira fase (o pico do edema) como mostrado na Figura 15 e 16. Essa fase inicial do edema está relacionada com a liberação de histamina e serotonina, enquanto que o platô está ligado ao recrutamento de neutrófilos e a liberação de citocinas e eicosanoides (ZULIANI *et al.*, 2005; ZYCHAR *et al.*, 2010).

A indução de edema pelas sPLA₂s pode ser atribuída a hidrólise dos fosfolípidios, favorecendo a síntese de eicosanoides. Contudo, as miotoxinas Lys49 (que são cataliticamente inativas devido à inabilidade de ligar o Ca²⁺) também são capazes de induzir edema, o que aponta para um mecanismo distinto para esse efeito farmacológico para esta classe de toxinas. O efeito da harpalicina 2 foi avaliado utilizando sPLA₂s ativas, e vários estudos mostram que quando a atividade catalítica das sPLA₂s ativas é inibida, ocorre redução significativa do edema e da miotoxicidade induzidas por essas enzimas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009; ZULIANI *et al.*, 2005; ZYCHAR *et al.*, 2010). No entanto, a relação entre atividade catalítica e a formação de edema ainda é um pouco contraditória, uma vez que não se sabe ao certo os mecanismos de ligação a superfície celular, a existência de proteínas

receptoras e, até onde de fato a atividade catalítica é responsável pela ação. Até o momento, acredita-se que o sítio de interação sPLA₂-célula é próximo ao sítio ativo e ao loop de ligação ao Ca²⁺, e por isso, a presença de certos inibidores no sítio ativo criaria um impedimento estérico para a ligação da sPLA₂ na superfície celular (HUANCAHUIRE-VEGA *et al.*, 2011).

Este parece ser o caso da harpalicina 2, que também inibiu significativamente a miotoxicidade das sPLA₂s testadas. Em relação ao modelo de miotoxicidade, quando este é avaliado utilizando sPLA₂s Asp49 como indutores, o mesmo serve para avaliar a ativação interfacial destas enzimas, uma vez que a miotoxicidade é causada pela hidrólise dos fosfolipídios de membrana que leva ao aumento do Ca²⁺ intracelular (sem descartar a participação de sítios de ancoragem da sPLA₂ a membrana das células musculares) (LAMBEAU; GELB, 2008). As sPLA₂s são as principais toxinas responsáveis pelo dano tecidual local nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003).

Recentemente o envolvimento de íons K⁺, do ATP e dos receptores purinérgicos foram apontados como amplificadores dos danos causados pelo influxo de Ca²⁺ na miotoxicidade induzida por sPLA₂s de espécies de *Bothrops* (CINTRA-FRANCISCHINELLI *et al.*, 2010). Os autores enfatizaram a papel dos receptores purinérgicos P2X e de seus inibidores na extensão do dano ao tecido muscular, dando uma explicação adicional ao fato de que o fármaco anti-*T. cruzi*, suramina, bloqueia parcialmente a miotoxicidade induzida por sPLA₂s Lys49 isoladas dos venenos de *B. asper* e *B. jararacussu*. A suramina também se liga aos receptores P2X, e essa propriedade poderia, pelo menos em parte, ser responsável pelo efeito inibidor desse fármaco. Atualmente esse efeito inibitório é atribuído a característica aniônica da molécula (ARRUDA *et al.*, 2002; FATHI; HARVEY; ROWAN, 2011; SIFUENTES *et al.*, 2008).

Vários flavonoides e isoflavonas são antagonistas de receptores purinérgicos, o que poderia explicar parcialmente o efeito inibidor destes compostos da miotoxicidade induzida por sPLA₂s de venenos (ALEXANDER, 2006). A inibição da miotoxicidade de sPLA₂s e do veneno bruto de várias espécies serpentes foi demonstrada pelos Grupos de Pesquisa de Farmacologia de Venenos e Toxinas e de Química de Macromoléculas para vários metabólitos secundários, incluindo os flavonoides quercetina, morina, naringina e rutina; a cumarina umbeliferona; e vários

alcaloides solanidânicos (COTRIM *et al.*, 2011; IGLESIAS *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2011; TORRES *et al.*, 2011; TOYAMA *et al.*, 2009).

Para avaliar a possibilidade de uma atividade anti-inflamatória *in vitro* mais ampla, a IC₅₀ da harpalicina 2 foi determinada utilizando diversas enzimas pró-inflamatórias (TABELA R1). Esses valores foram bem menores para os sPLA₂s de mamíferos GIA e GV, intermediário para COX-2, e relativamente altos para as demais enzimas (COX-1, LOX 5 e LOX 15), o que mostra que a harpalicina 2 é um melhor inibidor de sPLA₂s do que de COX/LOX, assim como apresentou uma certa preferência para COX-2 em relação a COX-1 (DHARMAPPA *et al.*, 2010)

O entendimento de como as pequenas moléculas (conhecidas como ligantes, neste caso específico a harpalicina 2) interagem com as proteínas, enzimas, receptores ou qualquer que seja o dito alvo farmacológico é de grande interesse para farmacologia e para o desenvolvimento de fármacos no geral. Várias abordagens podem ser utilizadas para prever a interação ligante-receptor e, dentre essas técnicas, os cálculos de *docking* têm obtido bons resultados em tempos relativamente reduzidos (JONES *et al.*, 1997).

Os cálculos de docking realizados neste trabalho revelaram uma tendência interessante entre os resultados de estabilidade do ligante nos sítios ativos das sPLA₂s (GOLD scores) e os valores de inibição da atividade catalítica. Em outras palavras, quando mais afinidade a harpalicina 2 teve pelo sítio ativo das sPLA₂s testadas, maior foi o percentual de inibição da atividade enzimática.

Como a sPLA₂ GIA isolada do veneno de *Naja naja* apresentou o maior GOLD score e os melhores resultados de inibição, sua estrutura cristalográfica foi escolhida para representar detalhadamente as interações intermoleculares (ligante-alvo). Observou-se que resíduos importantes do sítio ativo desta sPLA₂s, principalmente Gly30, Gly32 e Asp49, estão envolvidos em interações polares com a harpalicina 2, formando ligações de hidrogênio de 3,06, 3,35 e 2,60 Å, respectivamente (FIGURA 22).

Após estes testes de triagem da atividade antifosfolipásica A₂ (e anti-inflamatória *in vitro*), o efeito da harpalicina 2 sobre a PrTX-III foi avaliado mais detalhadamente, buscando compreender melhor o mecanismo de inibição desta isoflavona. Para isso, a inibição da atividade enzimática e da agregação plaquetária induzidas pela PrTX-III pela harpalicina 2 foi comparada com outros dois inibidores de sPLA₂s: o brometo de *p*-bromofenacila (p-BPB) e o ácido aristolóchico (Aris Ac).

Falando especificamente dos efeitos da harpalicina 2 sobre a PrTX-III, foi determinada uma IC_{50} de $11,34 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$ para HP-2. O inibidor padrão só apresentou uma inibição parcial nas concentrações testadas. Também foi observado que o tratamento com a harpalicina 2 favorecia a transição da forma dimérica para monomérica. Esta transição *per se* está implicada com uma redução de cerca de 100 vezes na velocidade de reação, pois interfere na cooperação substrato-enzima (para substratos agrupados em superfícies). Não se sabe ainda até que ponto isso influenciaria a atividade hidrolítica sobre substratos sintéticos não agrupados, como o 4N3OBA (HUANCAHUIRE-VEGA *et al.*, 2011; MADSEN *et al.*, 2011).

Quando o complexo PrTX-III:HP-2 foi analisado por dicroísmo circular, foi observado um desenovelamento parcial da proteína, o que comprova fisicamente a interação ligante-enzima (CORRÊA; RAMOS, 2008). A região N-terminal, o *loop* de ligação ao Ca^{2+} e os α -hélices centrais participam ativamente da atividade catalítica das sPLA₂s. Modificações nessas regiões levam à perda irreversível da atividade enzimática e/ou da capacidade de ligação a superfície celular (BERG *et al.*, 2001).

A PrTX-III induziu a agregação plaquetária de maneira concentração dependente. Este efeito foi completamente bloqueado pelo pré-tratamento com a harpalicina 2. No começo do experimento, contudo, foi observada uma pequena agregação que foi rapidamente revertida. Os outros inibidores testados, p-BPB e Aris Ac, tiveram apenas um efeito modesto na agregação.

Polgár *et al.* (1997) sugeriram que as sPLA₂s se ligam a um proteoglicano heparan sulfato ancorado a um glicofosfatidilinositol na membrana plaquetária. Alguns estudos de mutações pontuais na estrutura das sPLA₂s revelaram que a região de reconhecimento deste proteoglicano pela sPLA₂s está localizada próxima ao sítio ativo e ao *loop* de ligação ao Ca^{2+} . Esta mesma região seria o sítio de ligação teórica da harpalicina 2, e isso poderia estar influenciando diretamente a ligação da PrTX-III às plaquetas.

O efeito da harpalicina 2 nas plaquetas foi semelhante ao induzido pelo AACOCF₃, um inibidor seletivo de PLA₂ com efeito intracelular. Alguns trabalhos mostram que o distúrbio causado a membrana celular leva ao influxo de Ca^{2+} e a ativação de cPLA₂, resultando numa amplificação da liberação de ácido araquidônico (TENG; MA; OUYANG, 1985). A indometacina só inibiu parcialmente o efeito agregante da PrTX-III, esta droga é um inibidor de ciclo-oxigenase, além de um fraco inibidor de PLA₂.

A harpalicina 2 também poderia estar agindo na cascata das ciclo-oxigenases, um vez que ela bloqueia a agregação plaquetária induzida pela administração de ácido araquidônico, mostrando um mecanismo independente do bloqueio das sPLA₂s.

Alguns estudos mostram o efeito anti-agregante de outras isoflavonas, principalmente no modelo de agregação induzida por colágeno. Neste modelo, o colágeno se liga a glicoproteínas na superfície da plaqueta, o que resulta em um aumento do Ca²⁺ intracelular, seguido da ativação da proteína quinase C (PKC) e da fosfolipase A₂ citosólica, o que culminaria com a produção de tromboxano A₂. Os autores sugerem que as isoflavonas podem estar inibindo a agregação tanto pela inibição da cPLA₂ quanto da COX (GOTTSTEIN *et al.*, 2003; KONDO *et al.*, 2002).

Estes resultados experimentais corroboraram com as observações *in silico*, nas quais a harpalicina 2 apresentou a maior afinidade pelo sítio ativo da PrTX-III, em comparação com os outros dois inibidores (ácido aristolóchico e o brometo de p-bromofenacila). Novamente foi observado que os ligantes com os maiores GOLD scores eram os que inibiam melhor as ações da PrTX-III, neste caso a agregação plaquetária. Deste modo, os resultados sugerem que a inibição da agregação plaquetária esta relacionada à ligação da harpalicina 2 ao sítio ativo da sPLA₂s, interferindo assim na interação da PrTX-III com o substrato presente nas plaquetas.

Conclusão

7. Conclusão

Baseado nestes resultados experimentais, a harpalicina 2 se mostrou um bom inibidor de fosfolipases A_2 secretórias, em comparação com os inibidores padrão: ácido aristolóchico e brometo de p-bromofenacila;

Além da inibição da atividade enzimática, a harpalicina 2 foi capaz de inibir a miotoxicidade e a primeira fase do edema, ambos induzidos pela administração de sPLA₂s de venenos animais;

Os valores de IC₅₀ da harpalicina foram consideravelmente menores sobre fosfolipases A_2 secretórias do que sobre outras enzimas pró-inflamatórias;

Quando o enfoque foi dado nos efeitos da harpalicina 2 sobre a PrTX-III, observou-se que esta altera a estrutura da sPLA₂, com desenovelamento parcial e transição da forma dimérica para monomérica, sem contudo haver a formação de um complexo ligado covalentemente;

A harpalicina 2 reverteu a agregação plaquetária induzida pela administração de PrTX-III e ácido araquidônico, em um perfil semelhante ao observado quando foi utilizado o AACOCF₃, um inibidor seletivo de PLA₂ intracelular;

Os resultados de docking apontaram como a harpalicina 2 provavelmente se liga ao sítio ativo das sPLA₂s, inibindo suas atividades enzimáticas e tóxicas;

Esses resultados corroboram os dados etnobotânicos sobre o uso desta espécie como antiofídica e anti-inflamatória.

Estudos de modelagem molecular preditiva e semi-síntese serão realizados com o intuito de otimizar a estrutura da harpalicina 2 para melhorar seu efeito inibitório sobre as sPLA₂s.

Referências

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fárcamos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e pespectives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.

ALEXANDER, S. P. H. Flavonoids as antagonists at A₁ adenosine receptors. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 11, p. 1009-1012, 2006.

ARAÚJO, R. M. **Flavonoides e Floroglucinóis de *Harpalyce brasiliiana***: aspectos químicos, biológicos e espectroscópicos. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, Brasil, 2008.

ARRUDA, E. Z.; SILVA, N. M.; MORAES, R. A.; MELO, P. A. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 6, p. 723-726, 2002.

BERG, O. G.; GELB, M. H.; TSAI, M. D.; JAIN, M. K. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A₂-paradigm. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 2613-2653, 2001.

BIOMEDCACHE version 6.1, Copyright[©] 2000-2003 Fujitsu Limited, Copyright[©] 1989-2000.: Oxford Molecular Ltd; <http://www.cachesoftware.com>.

BOBIK, A. Secretory phospholipase A₂ type IIA: a regulator of immune function in atherosclerosis? **Cardiovascular Research**, n. 81, p. 9-10, 2009.

BOILARD, E.; LAI, Y.;LARABEE, K., BALESTRIERI, B.; GHOMASHCHI, F.; FUJIOKA, D.; GOBEZIE, R.; COBLYN, J. S.; WEINBLATT, M. E.; MASSAROTTI, E. M.; THORNHILL, T. S.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H.; LAMBEAU, G.; GELB, M. H.; ARM, J. P.; LEE, D. M. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A₂ in immune complex-mediated arthritis. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2., n. 5, p. 172-187, 2010.

BOWTON, D. L.; DMITRIENKO, A. A.; ISRAEL, E.; ZEIHNER, B. G.; SIDES, G. D. Impact of a soluble phospholipase A2 inhibitor on inhaled allergen challenge in subjects with asthma. **Journal of Asthma**, v. 42, p. 65-71, 2005.

BOYANOVSKY, B. B.; WEBB, N. R. Biology of Secretory Phospholipase A₂. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, p. 61-72, 2009.

BRADLEY, J. D.; DMITRIENKO, A. A.; KIVITZ, A. J.; GLUCK, O. S.; WEAVER, A. L.; WIESENHUTTER, C.; MYERS, S. L.; SIDES, G. D. A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial of LY333013, a selective inhibitor of group II secretory phospholipase A₂, in the treatment of rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 32, p. 417-423, 2005.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, p. 49-59, 2009.

CARON, E. J.; MANOCK, S. R.; MAUDLIN, J.; KOLESKI, J.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A.; SMALLIGEN, R. D. Apparent marked reduction in early antivenom reactions compared to historical controls: was it prophylaxis or method of administration? **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 779-783, 2009.

CHIOU, Y.-L.; LIN, S.-R.; HU, W.-P.; CHANG, L.-S. Quercetin modulates activities of Taiwan cobra phospholipase A₂ via its effects on membrane structure and membrane-bound mode of phospholipase A₂. **Journal of Biosciences**, v. 37, n. 2, p. 277-287, 2012.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; CACCIN, P.; CHIAVEGATO, A.; PIZZO, P.; CARMIGNOTO, G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. *Bothrops* snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 107, n. 32, p. 14140-14145, 2010.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009.

COTRIM, C. A.; OLIVEIRA, S. C. B.; DIZ-FILHO, E. B. S.; FONSECA, F. V.; BALDISSERA JR, L.; ANTUNES, E.; XIMENES, R. M.; MONTEIRO, H. S. A.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA, M. H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, p. 9-16, 2011.

COTRIM, C. A. **Avaliação dos efeitos da quercetina e da hecogenina sobre a atividade farmacológica e enzimática induzida por sPLA2 isoladas de venenos crotálicos e botrópicos**. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil, 2011.

COULTHARD, L. G.; COSTELLO, J.; ROBINSON, B.; SHIELS, I. A.; TAYLOR, S. M.; WOODRUFF, T. M. Comparative efficacy of a secretory phospholipase A₂ inhibitor with conventional anti-inflammatory agents in a rat model of antigen-induced arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 13:R42, 2011.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural Products From Plants**, 2ed, Taylor & Francis Group, 2006.

DA SILVA, G. L.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A.; BRAZ-FILHO, R. A New Isoflavone Isolated from *Harpalyce brasiliiana**. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 10, n. 6, p. 438-442, 1999.

DA SILVA, A. J. M.; COELHO, A. L.; SIMAS, A. B. C.; MORAES, R. A. M.; PINHEIRO, D. A.; FERNANDES, F. F. A.; ARRUDA, E. Z.; COSTA, P. R. R.; MELO, P. A. Synthesis and pharmacological evaluation of prenylated and benzylated pterocarpanes against snake venom. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 431-435, 2004.

DA SILVA, S. L.; CALGAROTTO, A. K.; MASO, V.; DAMICO, D. C. S.; BALDASSO, P.; VEBER, C. L.; VILLAR, J. A. F. P.; OLIVEIRA, A. R. M.; COMAR JR, M.; OLIVEIRA, K. M. T.; MARANGONI, S. Molecular modeling and inhibition of phospholipase A₂ by polyhydroxy phenolic compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 312-321, 2009.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**, DeLano Scientific, San Carlos, Calif, USA, 2002, <http://pymol.sourceforge.net>.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902-3909, 1985.

DHARMAPPA, K. K.; KUMAR, R. V.; NATARAJU, A.; MOHAMED, R.; SHIVAPRASAD, H. V.; VISHWENATH, B. S. Anti-Inflammatory Activity of Oleanolic Acid by Inhibition of Secretory Phospholipase A₂. **Planta Medica**, v. 75, p. 211-215, 2009.

DHARMAPPA, K. K.; MOHAMED, R.; SHIVAPRASAD, H. V.; VISHWANATH, B. S. Genistein, a potent inhibitor of secretory phospholipase A₂: a new insight in down regulation of inflammation. **Inflammopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 25-31, 2010.

DIVCHEV, D.; SCHIEFFER, B. The secretory phospholipase A₂ group IIA: a missing link between inflammation, activated rennin-angiotensin system, and atherogenesis? **Vascular Health and Risk Management**, v. 4, n. 3, p. 597-604, 2008.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 183-189, 2009.

EVANS, W. C. **Trease and Evans Pharmacognosy**, 16ed, Saunders Ltd, 2009.

FATHI, B.; HARVEY, A. L.; ROWAN, E. G. Suramin inhibits the early effects of PLA₂ neurotoxins at mouse neuromuscular junctions: A twitch tension study. **Journal of Venom Research**, v. 2, p. 6-10, 2011.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A. MARTÍNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, p. 537-552, 2009.

GARCÍA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic compound extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v.15, n.12, p. 8813-8826, 2010.

GIL, B.; SANZ, M. J.; TERCENIO, M. C.; GUNASEGARAN, R.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M. J. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A₂ with anti-inflammatory activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, n. 5, p. 733-740, 1997.

GOTTSTEIN, N.; EWINS, B. A.; ECCLESTON, C.; HUBBARD, G. P.; KAVANAGH, I. C.; MINIHANE, A.; WEINBERG, P. D.; RIMBACH, G. Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 607-615, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958-975, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 976-987, 2009

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v.42, n. 8, p. 915-931, 2003.

HAGE0-MELIM, L. I. S.; SILVA, C. H. T. P.; SEMIGHINI, E. P.; TAFT, C. A.; SAMPAIO, S. V. Computer-aided Drug Design of Novel PLA2 Inhibitor Candidates for Treatment of Snakebite. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2009.

HAMAGUCHI, K.; KUWATA, H.; YOSHIHARA, K.; MASUDA, S.; SHIMBARA, S.; OH-ISHI, S.; MURAKAMI, M.; KUDO, I. Induction of distinct sets of secretory phospholipase A₂ in rodents during inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1635, n. 1, p. 37-47, 2003.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HERNANDEZ-OLIVEIRA, S.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S. HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom. **Protein Journal**, v. 24, n. 4, p. 233-242, 2005.

HUANCAHUIRE-VEGA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; MARTINS-DE-SOUZA, D., MARANGONI, S. Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A₂ isolated from *Porthidium hyoprora* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 154, p. 108-119, 2011.

IBEAS, E.; FUENTES, L.; MARTÍN, R.; HERNÁNDEZ, M.; NIETO, M. L. Secreted phospholipase A2 type IIA as a mediator connecting innate and adaptive immunity: new role in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**, v. 81, p. 54-63, 2009.

IGLESIAS, C. V.; APARICIO, R., RODRIGUES-SIMIONI, L.; CAMARGO, E. A.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D. O.; BERIAM, L.O.; MONTEIRO, H. S. A.; TOYAMA, M. H. Effects of morin on snake venom phospholipase A2 (PLA2). **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 751-758, 2005.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DAY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **The FEBS Journal**, v. 278, p. 4544-4576, 2011.

KICMAN, A.; PARKIN, M.; ILES, R. An introduction to mass spectrometry based proteomics-detection and characterization of gonadotropins and related molecules. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 260-262, p. 212-227, 2007.

KIM, H. J.; PARK, S. H.; PARK, S. Y.; MOON, U. Y.; LEE, B. D.; YOON, S. H.; LEE, J. G.; BAEK, S. J.; YOON, J. H. Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1beta-induced MUC5AC gene expression and MUC5AC secretion in normal human nasal epithelial cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 8, p. 536-544, 2008.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KONDO, K.; SUZULI, Y.; IKEDA, Y.; UMEMURA, K. Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation. **European Journal of Pharmacology**, v. 455, n. 1, p. 53-57, 2002.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins and other Lipid Mediators**, v. 68-69, p. 03-58, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**, 8 ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LAMBEAU, G. M.; GELB, H. Biochemistry and Physiology of Mammalian Secreted Phospholipases A₂. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 77, p. 495-520, 2008.

LÄTTIG, J.; BÖHL, M.; FISCHER, P.; TISCHER, S.; TIETBÖHL, C.; MENSCHIKOWSKI, M.; GUTZEIT, H. O.; METZ, P.; PISABARRO, T. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A₂ by flavonoids: rationale for lead design. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, p. 473-483, 2007.

LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂. **Inflammation**, v.21, n.3, p.347-356, 1997.

LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, V. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenoming and their treatment. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p.1012-1028, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2ed, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MADSEN, J. J.; LINDEROTH, L.; SUBRAMANIAN, A. K.; ANDRESEN, T. L.; PETERS, G. H. Secretory Phospholipase A₂ Activity toward Diverse Substrates. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, p. 6853-6861, 2011.

MELO, M. M.; LÚCIA, M.; HABERMEHL, G. G. Plants extracts for topic therapy of *Bothrops alternatus* envenomation. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 29-34, 2007.

MONTECUCCO, C.; ROSSETTO, O.; CACCIN, P.; RIGONI, M.; CARLI, L.; MORBIATO, L.; MURARO, L.; PAOLI, M. Different mechanisms of inhibition of nerve terminals by botulinum and snake presynaptic neurotoxins. **Toxicon**, v. 54, n. 5, 561-564, 2009.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 18, p. 2897-2912, 2008.

MORS, W. B. Plants Active Against Snake Bite. **Economic and Medicinal Plant Research**, vol. 5, Plants and Traditional Medicine. Academic Press, 1991.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytochemistry**, v. 55, p. 627-642, 2000.

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y.; GIRARD, C.; YAMAMOTO, K.; LAMBEAU, G. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. **Biochimie**, v. 92, p. 561-582, 2010.

NANDA, B. L.; NATARAJU, A.; RAJESH, R.; RANGAPPA, K. S.; SHEKAR, M. A.; VISHWANATH, B. S. PLA₂ mediated arachidonate free radicals: PLA₂ inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants – a new role as anti-inflammatory molecule. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 765–777, 2007.

NARGOTRA, A.; SHARMA, S.; ALAM, M. I.; AHMED, Z.; BHAGAT, A.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N.; KOUL, S. In silico identification of viper phospholipase A₂ inhibitors: validation by in vitro, in vivo studies. **Journal of Molecular Modeling**, v. 17, p. 3063-3073, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**, 4ed, Freeman, 2004.

OLIVEIRA, D. G.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; BERIAM, L. O.; MARANGONI, S. Structural and functional characterization of basic PLA₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 21, p. 161-168, 2002.

OLIVEIRA, S. C.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; CAMARGO, E. A.; MORGANTI, R. P.; APARÍCIO, R.; TOYAMA, D. O.; BERIAM, L. O.; NUNES, E. V.; CAVADA, B.

S.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; NASCIMENTO, K. S.; TOYAMA, M. H. Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-acite PLA₂ by BLT-2, an isolectin isolated from the *Bryothamnion triquetrum* red alga. **BMC Biochemistry**, v. 9: 16, 2008.

PETROVIC, N.; GROVE, C.; LANGTON, P.; MISSO, N.; THOMPSON, P. A simple assay for a human serum phospholipase A₂ that is associated with high-density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 10, p. 1706-1713, 2001.

PITHAYANUKUL, P.; RUENRAROENGSACK, P.; BAVOVADA, R.; PAKMANEE, N.; SUTTISRI, R.; SAEN-OON, S. Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plants polyphenols. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 527-533, 2007.

POLGÁR, J.; KRAMER, R. M.; UM, S. L.; JAKUBOWSKI, J. A.; CLEMETSON, K. J. Human group II 14 kDa phospholipase A₂ activates human platelets. **Biochemical Journal**, v. 327, p. 259-265, 1997.

PRASAD, S.; PHROMNOI, K.; YADAV, V. R.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Targeting Inflammatory Pathways by Flavonoids for Prevention and Treatment of Cancer. **Planta Medica**, v. 76, p. 1044-1063, 2010.

RIGONI, M.; SCHIAVO, G.; WESTON, A. E.; CACCIN, P.; ALLEGRINI, F.; PENNUTO, M.; VALTORTA, F.; MONTECUCCO, C.; ROSSETTO, O. Snake presynaptic neurotoxins with phospholipase A₂ activity induce punctate swellings of neurites and exocytosis of synaptic vesicles. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 3561-3570, 2004.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISCHNAKONE, P.; CHOW, T. K. V. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A₂. **Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 048-057, 2012.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISCHNAKONE, P.; THWIN, M. M.; CHOW, T. K. V.; BOW, H.; YAP, E. H.; THONG, T. W. J. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee

venoms: a comparison with purified venom phospholipase A₂ enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 650-659, 2007.

SANTOS, M. L.; FAGUNDES, F. H.; TEIXEIRA, B. R.; TOYAMA, M. H.; APARICIO, R. Purification and Preliminary Crystallographic Analysis of a New Lys49-PLA₂ from *Bothrops jararacussu*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 736-750, 2008.

SANTOS, M. L.; TOYAMA, D. O.; OLIVEIRA, S. C. B.; COTRIM, C. A.; DIZ-FILHO, E. B. S.; FAGUNDES, F. H. R.; SOARES, V. C. G.; APARICIO, R.; TOYAMA, M. H. Modulation of the Pharmacological Activities of Secretory Phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* Induced by Naringin. **Molecules**, v. 16, p. 738-761, 2011.

SCOTT, D. L.; SIGLER, P. B. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A₂. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 53-88, 1994.

SIFUENTES, D. N.; EL-KIK, C. Z.; RICARDO, H. D.; TOMAZ, M. A.; STRAUCH, M. A.; CALIL-ELIAS, S.; ARRUDA, E. Z.; SCHWARTZ, E. F.; MELO, P.A. Ability of suramin to antagonize the cardiotoxic and some enzymatic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 51, p. 28-36, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ed, Santa Catarina: Editora da UFSC, 2007.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 11, p. 287-313, 1997.

TEDESCO, E.; RIGONI, M.; CACCIN, P.; GRISHIN, E.; ROSSETTO, O.; MONTECUCCO, C. Calcium overload in nerve terminals of cultured neurons intoxicated by alpha-latrotoxin and snake PLA₂ neurotoxins. **Toxicon**, v. 54, n. 2, p. 138-144, 2009.

TEIXEIRA, S. S.; **Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *Bothrops pirajai***. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, Brasil, 2009.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947-962, 2003.

TENG, C. M.; MA, Y. H.; OUYANG, C. H. Action mechanism of the platelet aggregation inducer and inhibitor from *Echis carinatus* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 841, n. 1, p. 8-14, 1985.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B. S.; ZARA, F. J.; DE QUEIROZ, M. G. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; OLIVEIRA, M. R.; TOYAMA, D. O.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A. M. C. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 795-804, 2010.

TORRES, M. C. M.; PINTO, F. C. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; JORGE, R. J. B.; XIMENES, R. M.; MONTEIRO, H. S. A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; DIZ-FILHO, E. B. S.; TOYAMA, M. H. Antiophidic Solanidane Steroidal Alkaloids from *Solanum campaniforme*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2168-2173, 2011.

TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; DIZ-FILHO, E. B. S.; OLIVEIRA, S. C. B.; TOYAMA, M. H. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A₂

(sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Toxicon**, v. 53, n. 4, p. 417-426, 2009.

TOYAMA, M. H.; COSTA, P. D.; NOVELLO, J. C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; MARANGONI, S. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA2 and anticoagulant activities and high myotoxic activity. **Protein Journal**, v. 18, n. 3, p. 371-378, 1999.

TOYAMA, M. H.; OLIVEIRA, D. G.; BERIAM, L. O.; NOVELLO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA2 isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 1033-1038, 2003.

TOYAMA, M. H.; RODRIGUES, S. D.; TOYAMA, D. O.; SOARES, V. C. G.; COTRIM, C. A.; XIMENES, R. M.; SANTOS, M. L. Phospholipases A₂ Protein Structure and Natural Products Interactions in Development of New Pharmaceuticals, In: FARAGGI, E. **Protein Structure**. InTech, 2012.

VAN DIJK, A.; KRIJNEN, P. A. J.; VERMOND, R. A.; PRONK, A.; SPREEUWENBERG, M.; VISSER, F. C.; BERNEY, R.; PAULUS, W. J.; HACK, E.; VAN MILLIGEN, F. J.; NIESSEN, H. W. M. Inhibition of type 2A secretory phospholipase A2 reduces death of cardiomyocytes in acute myocardial infarction. **Apoptosis**, v. 14, p. 753-763, 2009.

VAN HOORN, D. E. C.; VAN NORREN, K.; BOELENS, P. G.; NIJVELDT, R. J.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Biological Activities of Flavonoids. **Science and Medicine**, v. 9, n. 3, p. 152-161, 2003.

VERHEIJ, H. M.; VOLWERK, J. J.; JANSEN, E. H.; PUYK, W. C.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; DE HAAS, G. H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 743-750, 1980.

VON MARTIUS, C. F. P. **Flora Brasiliensis**, Berlim, 1859. Acessado em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/>. Data de acesso: 10/06/2009.

WANG, W.; ZHANG, J.; WU, W.; LI, J.; MA, Y.; CHEN, W.; YAN, H.; WANJ, K. Inhibition of Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ Ameliorates Inflammation and Decreases Atherosclerotic Plaque Formation in ApoE-Deficient Mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, e23425, 2011.

XIMENES, R. M. **Avaliação da atividade da cabenegrina A-II frente às alterações bioquímicas e hematológicas e aos efeitos pressóricos induzidos pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em ratos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, Brasil, 2009.

YANG, C. S.; LAMBERT, J. D.; HOU, Z.; JU, J.; LU, G.; HAO, X. Molecular targets for the cancer preventive activity of tea polyphenols. **Molecular Carcinogenesis**, v. 45, n. 6, P. 431-435, 2006.

YEDGAR, S.; COHEN, Y.; SHOSEYOV, D. Control of phospholipase A₂ activities for the treatment of inflammatory conditions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 1373-1382, 2006.

YEDGAR, S.; LICHTENBERG, D.; SCHNITZER, E. Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 182-187, 2000.

ZEIHER, B. G.; STEINGRUB, J.; LATERRE, P. F.; DMITRIENKO, A.; FUKIISHI, Y.; ABRAHAM, E. LY315920NA/S-5920, a selective inhibitor of group IIA secretory phospholipase A₂, fails to improve clinical outcome for patients with severe sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 33, p. 1741-1748, 2005.

ZULIANI, P. J.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 35-346, 2005.

ZYCHAR, B. C.; DALE, C. S.; DEMARCHI, D. S.; GONÇALVES, L. R. C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 227-234, 2010.

Apêndices

APÊNDICE A – Trabalhos publicados com os resultados desta tese de doutorado.

XIMENES, R. M.; RABELLO, M. M.; ARAÚJO, R. M.; SILVEIRA, E. R.; FAGUNDES, F. H. R.; DIZ-FILHO, E. B. S.; BUZZO, S. C.; SOARES, V. C. G.; TOYAMA, D. O.; GAETA, H. H.; HERNANDES, M. Z.; MONTEIRO, H. S. A.; TOYAMA, M. H. Inhibition of Neurotoxic Secretory Phospholipases A₂ Enzymatic, Edematogenic, and Myotoxic Activities by Harpalycin 2, an Isoflavone Isolated from *Harpalyce brasiliiana* Benth. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, Article ID 987517, 2012.

XIMENES, R. M.; ALVES, R. S.; PEREIRA, T. P.; ARAÚJO, R. M.; SILVEIRA, E. R.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; SOARES, V. C. G.; BRISTOT, D.; PIRES, C. L.; TOYAMA, D. O.; GAETA, H. H.; MONTEIRO, H. S. A.; TOYAMA, M. H. Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* venom. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12: 139, 2012.

Apêndice B – Trabalhos publicados como resultado de colaborações durante o período do doutorado.

XIMENES, R. M.; MELO, A. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; SOUZA, I. A.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Antitumor activity of leaves from *Hyptis mutabilis* (A. Rich.) Briq. (Lamiaceae) in mice bearing tumor. **Dataset Papers in Pharmacology**, v. 2013, p. 1-3, 2012.

FARIAS, E. M. F. G.; XIMENES, R. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; CHIAPPETA, A. A.; SENA, K. X. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 3, p. 63-67, 2012.

COTRIM, C. A.; OLIVEIRA, S. C. B.; DIZ-FILHO, E. B. S.; FONSECA, F. V.; BALDISSERA JR., L.; ANTUNES, E.; XIMENES, R. M.; MONTEIRO, H. S. A.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA, M. H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A₂. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, n. 1-2, p. 9-16, 2011.

JORGE, R. J. B.; MARTINS, A. M. C.; MORAIS, I. C. O.; XIMENES, R. M.; RODRIGUES, F. A. R.; SOARES, B. M.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; TOYAMA, M. H.; MARTINS, A. M. A.; MORAES FILHO, M. O.; MONTEIRO, H. S. A. In vitro studies on *Bothrops* venoms cytotoxic effect on tumor cells. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 9, p. 249-253, 2011.

TORRES, M. C. M.; PINTO, F. C. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; JORGE, R. J. B.; XIMENES, R. M.; MONTEIRO, H. S. A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; DIZ-FILHO, E. B. S.; TOYAMA, M. H. Antiophidic Solanidane Steroidal Alkaloids from *Solanum campaniforme*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2168-2173, 2011.

PEREIRA, T. P.; BEZERRA DE MENEZES, R. R. P. P.; TORRES, A. F. C.; BRITO, T. S.; BATISTA-LIMA, F. J.; VINHOTE, J. F. C.; SOUSA, D. F.; XIMENES, R. M.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B. S.; MAGALHÃES P. J. C.; MONTEIRO, H. S. A.;

MARTINS, A. M. C. Renal and vascular effects of *Crotalus durissus cumanensis* venom and its crotoxin fraction. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 17, p. 199-208, 2011.

SILVA, M. R.; XIMENES, R. M.; COSTA, J. G. M.; LEAL, L. K. A. M.; LOPES, A. A.; VIANA, G. S. B. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 381, n. 5, p. 415-426, 2010.

Research Article

Inhibition of Neurotoxic Secretory Phospholipases A₂ Enzymatic, Edematogenic, and Myotoxic Activities by Harpalycin 2, an Isoflavone Isolated from *Harpalyce brasiliiana* Benth

Rafael M. Ximenes,¹ Marcelo M. Rabello,² Renata M. Araújo,^{3,4} Edilberto R. Silveira,⁴ Fábio H. R. Fagundes,^{5,6} Eduardo B. S. Diz-Filho,^{5,6} Simone C. Buzzo,^{5,6} Veronica C. G. Soares,^{5,6} Daniela de O. Toyama,⁷ Henrique H. Gaeta,⁶ Marcelo Z. Hernandez,² Helena S. A. Monteiro,¹ and Marcos H. Toyama⁶

¹ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo 1315, 60430-270 Fortaleza, CE, Brazil

² Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, PE, Brazil

³ Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 50078-970 Natal, RN, Brazil

⁴ Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREN), Universidade Federal do Ceará, 60455-760 Fortaleza, CE, Brazil

⁵ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biomedicina, Universidade de Campinas, 13082-862 Campinas, SP, Brazil

⁶ Unidade de São Vicente, Campus do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, 11330-900 São Vicente, SP, Brazil

⁷ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Presbiteriana Mackenzie, 01302-970 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Helena S. A. Monteiro, hsamonteiro@gmail.com

Received 26 March 2012; Revised 19 June 2012; Accepted 22 June 2012

Academic Editor: Jang-Hern Lee

Copyright © 2012 Rafael M. Ximenes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂) exert proinflammatory actions through lipid mediators. These enzymes have been found to be elevated in many inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis, sepsis, and atherosclerosis. The aim of this study was to evaluate the effect of harpalycin 2 (Har2), an isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliiana* Benth., in the enzymatic, edematogenic, and myotoxic activities of sPLA₂ from *Bothrops pirajai*, *Crotalus durissus terrificus*, *Apis mellifera*, and *Naja naja* venoms. Har2 inhibits all sPLA₂ tested. PrTX-III (*B. pirajai* venom) was inhibited at about 58.7%, Cdt F15 (*C. d. terrificus* venom) at 78.8%, Apis (from bee venom) at 87.7%, and Naja (*N. naja* venom) at 88.1%. Edema induced by exogenous sPLA₂ administration performed in mice paws showed significant inhibition by Har2 at the initial step. In addition, Har2 also inhibited the myotoxic activity of these sPLA₂s. In order to understand how Har2 interacts with these enzymes, docking calculations were made, indicating that the residues His48 and Asp49 in the active site of these enzymes interacted powerfully with Har2 through hydrogen bonds. These data pointed to a possible anti-inflammatory activity of Har2 through sPLA₂ inhibition.

1. Introduction

The flavonoids are a group of plant secondary metabolites widely distributed in nature. They are divided in two main classes: the flavonoids and the isoflavonoids. Many pharmacological activities have been described for both classes such as anti-inflammatory and antioxidant, antiallergic, antiviral,

and anticancer [1, 2]. Many works have shown the phospholipase A₂ (PLA₂) inhibitory effects of flavonoids such as rutin [3], morin [4], and quercetin [5], however, only few works have been shown the antiphospholipase A₂ activity of isoflavonoids [6].

The PLA₂s are a class of enzymes (EC 3.1.1.4) that catalyzes the hydrolysis of the sn-2 ester bond of phospholipids

to produce lysophospholipids and free fatty acids, which are substrates for the synthesis of proinflammatory eicosanoids and platelet aggregating factor (PAF) [7, 8], in addition to reactive oxygen species produced during the synthesis of eicosanoids (which play a role as a positive feedback of the enzymatic active of the PLA₂) [9]. They are divided in two major groups: cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) and secretory phospholipase A₂ (sPLA₂). The last are divided in ten groups as discussed elsewhere [10]. In many inflammatory diseases, as in sepsis, atherosclerosis, and rheumatoid arthritis, group IIA sPLA₂ are found in the inflammatory areas and play a role not fully understood up to date [11, 12].

The sPLA₂ present in animal venoms share structural features with mammalian (including human) group IIA sPLA₂, mainly in the active site, being for that reason useful tools for the study of sPLA₂ inhibitors [7–12]. The exogenous administration of these enzymes to experimental animals provokes an inflammatory response similar to that observed with administration of endogenous sPLA₂, besides more specific responses as myonecrosis [5, 13].

Current anti-inflammatory therapies include nonsteroidal anti-inflammatory drugs that inhibit either LOX or COX-1/2 enzymes and have serious side effects such as gastrointestinal ulceration, bleeding, and cardiovascular complications. In addition to these problems, COX-1/2 and LOX inhibitors cannot regulate the production of the PAF, which continues causing inflammation [7, 8]. Effective inhibitors of sPLA₂ could be capable of depleting the downstream proinflammatory metabolites of arachidonic acid as well as PAF, without the adverse effects of the current corticosteroids therapy since these enzymes are secreted only in pathological conditions [7–10].

Harpalyce brasiliiana Benth. (Fabaceae) is a Brazilian folk medicine, popularly known as “raiz-de-cobra” (Port. Lit. *snakeroot*). Its roots have been used in the Northeast of Brazil to treat snakebite [14], while its leaves are claimed to be anti-inflammatory (personal unpublished data). In this paper, the effect of harpalycin 2 in structure and enzymatic, edematogenic, and myotoxic activities of four sPLA₂ isolated from animal venoms was evaluated. In addition, the analysis of the interaction between harpalycin 2 and the active site of the tested sPLA₂ was performed by docking calculations.

2. Material and Methods

2.1. Material. Secretory PLA₂ from *Bothrops pirajai* (PrTx-III) and *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15) were purified as described by Toyama et al. [15, 16], respectively. sPLA₂ from *Apis mellifera* venom was purchased from BIOMOL International. Bovine pancreas and *Naja naja* venom sPLA₂ were purchased from Sigma-Aldrich. The COX-1, COX-2, LOX 15hrc, and LOX 15syP1 came from Cayman Chemical. Other salts, reagents, solvents were ultrapure grade, HPLC grade, or sequencing grade purchase from the BIORAD, Sigma-Aldrich (Supelco) and Pharmacia.

2.2. Plant Material. Leaves of *Harpalyce brasiliiana* Benth. were collected at the Chapada do Araripe, Barbalha (Ceará,

Brazil) by Prof. E. R. Silveira. Botanical authentication was made by Prof. E. P. Nunes of the Department of Biology, Federal University of Ceará. Voucher specimen (number: 32525) has been deposited at the Prisco Bezerra Herbarium (EAC), Department de Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza (Ceará, Brazil).

2.3. General Procedures. The mass spectra were obtained on a Hewlett-Packard 5971 mass spectrometer by electron impact ionization (70 eV). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX-500 (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C); chemical shifts were expressed in scale and were referenced to residual DMSO (2.5 and 39.5 ppm). Silica Gel 60 (Merck, 70–230 mesh) was used for analytical TLC. Column chromatographies were performed over silica gel (Merck, 60 F254 230–400 mesh).

2.4. Extraction and Isolation of Harpalycin 2. Leaves of *Harpalyce brasiliiana* were pulverized and extracted with EtOH at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure which produced a dark viscous extract (HBFE). Liquid-liquid partition of a water suspension of HBFE (110 g) using petrol ether, CHCl₃, EtOAc, and n-BuOH yielded five fractions after solvent evaporation: HBFEep (24.5 g), HBFEc (22.4 g), HBFEa (6.8 g), HBFEb (30.4 g), and HBFEaq (21.2 g).

Flash chromatography of HBFEc (12.0 g) using n-hexane and EtOAc as binary mixtures of increasing polarity afforded 30 fractions, which were pooled in 9 fractions after thin layer chromatography (TLC) analysis. HBFEc (10–12) presented a yellow precipitate, yielding 120.0 mg after recrystallization. NMR and Mass-spectrometric analysis showed the structure of the isoflavone harpalycin 2 (Har2). The fractions HBFEc (8-9) and HBFEc (13–17) were purified, using the same method, yielding more 200.0 mg of Har2.

2.5. Inhibition of sPLA₂ Activity. sPLA₂ activity was measured following the protocols described by Hernandez-Oliveira et al. [17] and modified by Toyama et al. [18] for 96-well plate. The standard assay mixture contained 200 mL of buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 100 mM, and NaCl, pH 7.8), 20 μL of substrate (4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (4N3OBA) 1 mg/mL, manufactured by BIOMOL, USA), 20 μL of water, and 20 μL of sPLA₂ solution (1 mg/mL). Enzymatic activity was calculated based on the increase in absorbance at 425 nm after 20 min, at 37°C, as a direct result of the cleavage of the synthetic substrate. All assays were done using *n* = 12 and absorbance was measured using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Evaluation of Har2 effect on sPLA₂ enzymatic activity was performed after incubation of *Bothrops pirajai* (PrTx-III), *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15), *Apis mellifera* (purified, without the mellitin component), and *Naja naja* sPLA₂ with Har2 at equal mass (1 : 1; w : w) for a period of 30 minutes. The final concentration of the inhibitor in the reaction mixture was the same of the substrate due to the kinetic behavior of the sPLA₂.

2.6. Animals. Male Swiss mice (20–25 g) obtained from the Animal Facilities of Federal University of Ceará were used in this study. The animals were maintained under standard conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; 12 h light/dark cycle) with food and water *ad libitum*. All experiments with animals were guided in accordance with Brazilian laws for Care and Use of Laboratory Animals and all the study protocols were approved by Committee of Ethics from Federal University of Ceará (Fortaleza, Brazil) protocol number 68/08.

2.7. Neutralization of the Edema Inducing Activity. Neutralization of sPLA₂-induced paw edema by Har2 was performed according to Iglesias et al. [4], using male Swiss mice (20–25 g, $n = 6$). The edema was induced by a single subplantar injection of 25 μL of sPLA₂ (25 $\mu\text{g}/\text{paw}$). Paw volume was measured immediately before the injection of the samples and at selected time intervals thereafter (30, 60, 120, 240, and 480 minutes) using a plethysmometer (Ugo Basile, Italy). All samples were dissolved in sterile PBS. Results were expressed as the increase in paw volume (μL) and calculated by subtracting the basal volume. Evaluation of Har2 effect on sPLA₂ edema-inducing activity was carried out after incubation of *Bothrops pirajai* (PrTx-III), *Crotalus durissis terrificus* (Cdt F15), *Apis mellifera* (purified, without the mellitin component), and *Naja naja* sPLA₂ with Har2 at equal mass (1 : 1; w : w) for 30 minutes at 37°C . The negative controls were performed by administration of Har2 (25 $\mu\text{g}/\text{paw}$). These values were subtracted from the volume of the paws treated with sPLA₂ incubated with Har2 for clarity reasons.

2.8. Neutralization of Myotoxic Activity. Plasma creatine kinase (CK) activity was measured using a CK-UV kinetic kit (Sigma Chemical Co.). Native sPLA₂ (1 mg/mL) or those previously incubated with Har2, as described above, were injected intramuscularly (25 μL) in the gastrocnemius of male Swiss mice (20–25 g, $n = 6$). The control group was injected with sterile PBS, and the negative control with Har2. After 3 hours, a blood sample was collected from the tails using heparinized capillary tubes and centrifuged for plasma separation. CK activity was determined in triplicate using 4 μL of plasma according to the manufacturer's instructions, and its activity was expressed in U/L.

2.9. Characterization of IC₅₀ of Har2 against Several sPLA₂ and Inflammatory Enzymes. The inhibitory capability of Har2 against COX-1/2, LOX 15hrc, and 15syP1, bovine pancreas, and human group V sPLA₂ was investigated according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical). All assays were carried out using $n = 12$ and the data measured using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Har2 was added in different concentrations and IC₅₀ values were calculated using GraphPad Prism 5.0.

2.10. Circular Dichroism Spectroscopy. Native sPLA₂, and Har2-treated sPLA₂ were dissolved in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and final protein concentrations were adjusted to 8.7 mM. After centrifugation at 4000 g for 5 min,

samples of 20 μL were injected into molecular exclusion column TSK G4000SWXL (0.7×300 mm) coupled in the LC-2000Plus Series HPLC Systems (Jasco, USA), which have been previously equilibrated with same buffer used for the preparation of the samples sPLA₂, Har2-treated sPLA₂. In this case, the chromatographic run of each samples was simultaneously monitored using a CD-2095 Circular Dichroism HPLC detector (Jasco, USA), FP-2020 Fluorescence detector, and UV-2075 190 to 600 nm detector. Circular dichroism spectra were obtained by adjust the wavelength range 220–260 nm and 260–320 nm to measure the presence of random coil and tertiary protein folding, respectively. Data collection was performed with a bandwidth of 1 nm, response time of 1 s at room temperature with 100 nm/min scanning speed. The fluorescence detection was adjusted specifically for monitoring the fluorescence emission of tryptophan, which was measured between 300 and 450 nm after excitation at 280 nm.

2.11. Molecular Modeling (Docking). The structural optimization of the harpalycin 2 ligand was initially achieved using the AM1 method [19] implemented in the BioMedCache program (BioMedCache, 1989) with default values for the convergence criteria. Docking calculations were performed with the GOLD 4.0 program [20] in order to obtain the relative *in silico* affinities of the Har2 ligand with respect to the sPLA₂ targets. The sPLA₂ structures were taken from the RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org/>), under the PDB ID: 1GMZ, 2QOG, 1PSH, and 1POC, respectively, for PrTX-III, Cdt F15, Naja, and Apis.

The docking calculations were performed taking advantage of the flexibility of the Har2 ligand, by activating its rotational degrees of freedom. The active site was defined as all atoms within a radius of 10.0 Å from the residue 48 (His or Asp), which is an important residue according to the literature [21, 22].

2.12. Statistical Analysis. Results were expressed as the mean \pm SEM of replicated experiments. The significance of differences between means was assessed by an analysis of variance, followed by a Dunnett's test where several experimental groups were compared with the control group. The confidence limit for significance was set at $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

Natural products from plants are of potential interest for the treatment of a number of inflammatory diseases. They serve as template molecules for the development of new drugs and prototypes [12]. Flavonoids are polyphenolic compounds widely distributed in plants. Due to their various effects on immune and inflammatory systems, these compounds are currently of great pharmacological interest [3]. There are several reports demonstrating that flavonoids are able to inhibit PLA₂ activity, arachidonic acid release, and the formation of arachidonic acid metabolites [3, 4, 13]. In particular, isoflavones have also been reported to show

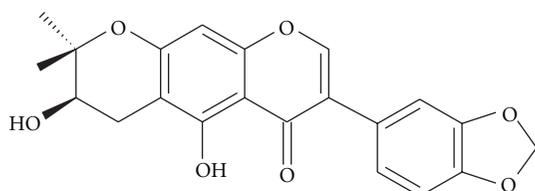


FIGURE 1: The structure of harpalycin 2.

anti-inflammatory activities, including inhibition of phospholipases A₂ and COX-1/2 [17, 18]. Harpalycin 2 (Har2) was isolated as a white amorphous solid with m.p. 232.6–234.4°C. Its molecular formula of C₂₁H₁₈O₇ was established by the molecular ion at m/z 382 Daltons in the MS spectrum. Structure elucidation was performed by spectroscopic means, including 1D and 2D NMR, and comparison with the data from literature [14]. The structure of Har2 is shown in Figure 1.

Group IIA secretory phospholipases A₂ may be catalytically active or inactive depending on the amino acid residue 49. In catalytically active isoforms, this residue is occupied by an aspartic acid [24]. Cotrim et al. [5] showed through docking calculations that the chemical treatment of crotoxin B (Cdt F15) with quercetin lead to an inhibition of enzymatic activity due to the fact that quercetin binds in the vicinity of His48 and Asp49 residues. Herein, Har2 inhibits all sPLA₂ tested when the treatment was made before the substrate addition, with percentages of inhibition at about 58.7% for PrTX-III, at 78.8% for Cdt F15, at 87.7% for Apis, and at 88.1% for Naja secretory phospholipase A₂ (Figure 2). These percentages of inhibition were greater than p-bromophenacyl bromide (~40%), a well-known sPLA₂ inhibitor [5].

Neutralization of edema induced by exogenous sPLA₂ administration performed in mice paws by harpalycin 2 showed significant inhibition of the edema initial step induced by PrTX-III, Cdt F15, Apis, and Naja (Figure 3). This first step is correlated with histamine/serotonin involvement [24]. The edema-inducing effect of sPLA₂s could be attributed to their ability to hydrolyse phospholipids; however Lys49 phospholipase A₂-homologues can also induce edema in the absence of PLA₂ activity, which implies a different mechanism of action for this pharmacological effect [24]. In this case, all sPLA₂ tested were catalytic active and the partial inhibition of edema formation may be correlated to the inhibition of phospholipids catalysis by the isoflavone.

Harpalycin 2 was able to inhibit the myotoxic activity of the venom secretory phospholipases A₂ tested in this study (Figure 4), which is a pharmacological activity shared by several types of snake venom sPLA₂ [25]. This model, when studied using Asp49 sPLA₂, is interesting for evaluation of the interfacial activation of the sPLA₂s, since myotoxicity is directed linked with enzymatic activity in the catalytic sPLA₂ isoforms [7]. Recently, involvement of potassium, ATP, calcium, and purinergic receptors in the myotoxic activity of snake venom sPLA₂ was described by Cintra-Francischinelli et al. [23]. The authors emphasized the role

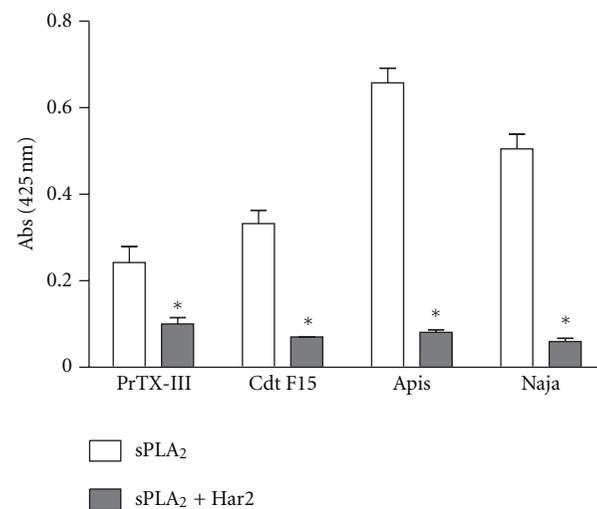


FIGURE 2: Effect of harpalycin 2 (Har2) on enzymatic activity of sPLA₂ from *Bothrops pirajai* (PrTX-III), *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15), *Apis mellifera* (Apis), and *Naja naja* (Naja) venom expressed as initial velocity of reaction after 20 min (V₀). (a) Native sPLA₂ enzymatic activity and (b) harpalycin 2 treated sPLA₂ enzymatic activity. Data expressed as mean ± S.E.M. and analyzed by ANOVA followed by Dunnett's test, with *P set at 0.05.

of the purinergic receptor P2X and its inhibitors in the extent of muscle tissue damage, giving an additional explanation to the finding that the antitrypanosomal drug suramin provides protection from the toxic effect of the Lys49 myotoxins of the *Bothrops jararacussu* and *Bothrops asper* venoms. Suramin also binds to P2X channels, and this property could, at least in part, account for its myotoxic inhibitory activity. Several flavonoids and isoflavones antagonize purinergic receptors [26] which could explain in part the inhibitory effect of these compounds in the myotoxic activity of snake venom sPLA₂.

In order to elucidate the anti-inflammatory activity of harpalycin 2, we further examined the ability of Har2 to inhibit the enzymatic activity of COX-1/2 and LOX 15hrc and 15syP1 as well as bovine pancreas PLA₂ and human group V PLA₂. Har2 showed lower IC₅₀ values for both bovine and human sPLA₂ than for COX-1/2 and LOX enzymes, as shown in Table 1. These results showed that harpalycin 2 has probably more affinity for sPLA₂ than for other proinflammatory enzymes.

Aiming to understand how harpalycin 2 interacts with these sPLA₂s, CD spectroscopy, fluorescence analysis, and docking calculations were performed. Fluorescence profile analysis of Har2, sPLA₂s, and Har2:sPLA₂s showed significant changes in the spectral fluorescence profile among Har2 and the sPLA₂ treated with Har2. CD analysis of native and Har2-treated sPLA₂ revealed that the treatment induced discrete unfolding of sPLA₂, which did not modify the tridimensional structure of the proteins (See supplementary material, available at doi: 10.1155/2012/987517).

The sPLA₂ structures were represented by the PDB IDs 1GMZ, 2QOG, 1PSH, and 1POC, respectively, for PrTX-III, Cdt F15, Naja, and Apis. The calculated docking score values

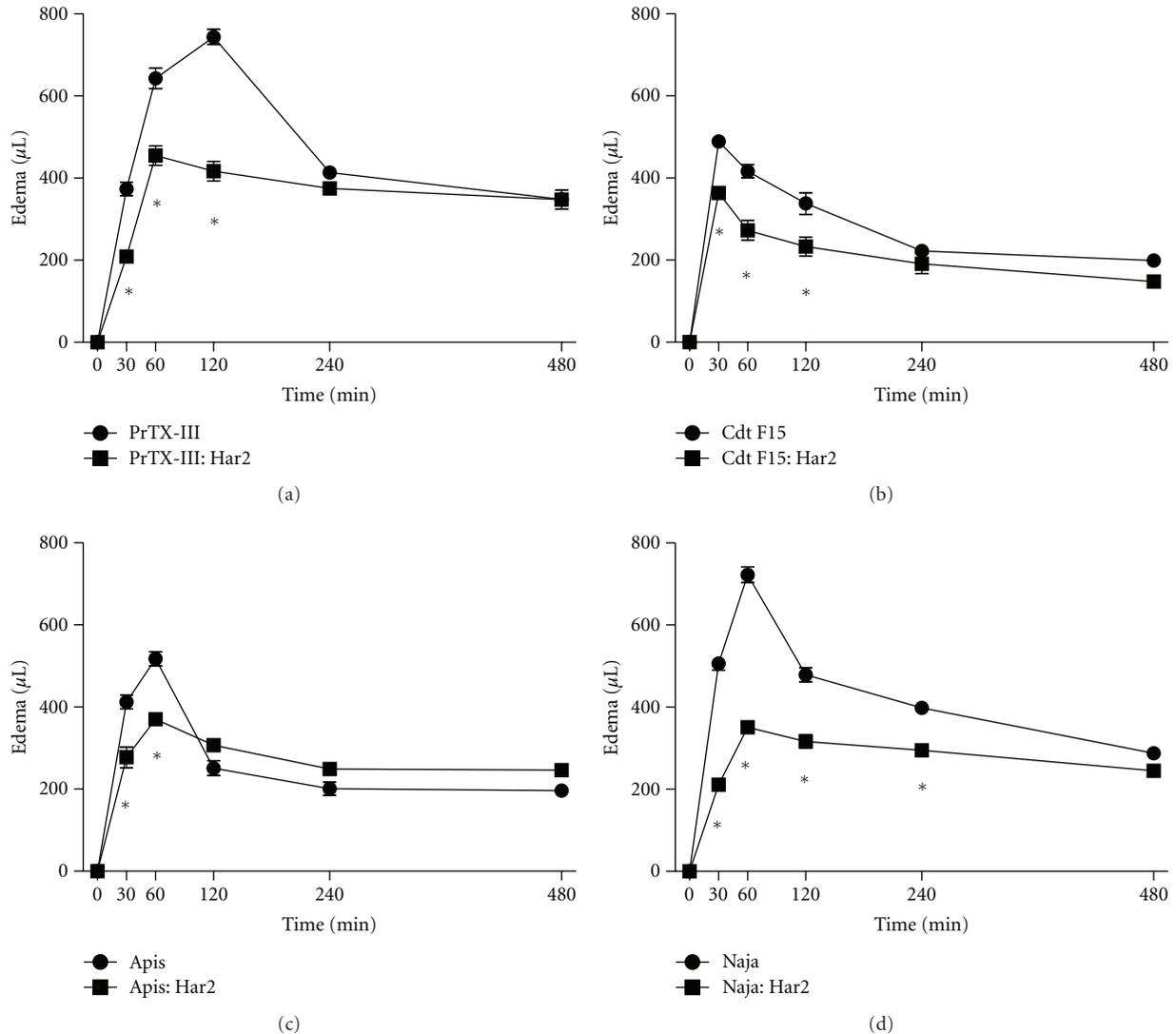


FIGURE 3: Effect of harpalycin 2 (Har2) on edema formation after a single subplantar injection of sPLA₂ (25 μ g/paw) from (a) *Bothrops pirajai* (PrTX-III), (b) *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15), (c) *Apis mellifera* (Apis), and (d) *Naja naja* (Naja) venom expressed as the increase in paw volume (μ L). Native sPLA₂ edematogenic activity is represented by circles whereas harpalycin 2 treated sPLA₂ edematogenic activity is shown as squares. Data expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by ANOVA followed by Dunnett's test, with *P set at 0.05.

TABLE 1: Inhibition of enzymatic activity of proinflammatory enzymes by harpalycin-2.

Enzymes	IC ₅₀ (μ g/mL)
PrTX-III	11.34
BPPLA ₂	11.90
HGVPLA ₂	27.42
COX-1	131.90
COX-2	32.73
LOX 15HRC	55.96
LOX 15SY	N/D

Note: PrTX-III (piratoxin-III); BPPLA₂ (bovine pancreas PLA₂); HGVPLA₂ (human group V PLA₂); COX-1 (cyclooxygenase-1); COX-2 (cyclooxygenase-2); LOX 15HRC (Lipoxygenase 15hrc); LOX 15SY (Lipoxygenase 15sy). N/D (Not determined).

(GOLD scores) for these targets were 33.93, 44.12, 55.26, and 51.23, respectively, for PrTX-III, Cdt F15, Naja, and Apis. One can see in Figure 5 that an interesting trend between the *in silico* (docking scores) and *in vitro* (percentages of inhibition) results was observed. This means that greater stability (the most positive docking score values) of the complex between the harpalycin 2 and the four sPLA₂ enzymes is related to greater inhibition percentage of the enzymatic activities. Thus, harpalycin 2 has inhibitory capacity against the enzymatic, edematogenic, and myotoxic activities from neurotoxic venom secretory phospholipases A₂, probably due to the interaction with residues 48 and 49 in the active site of these toxins. Comparing the amino acid sequences alignment performed by Clustal X [27] among the four sPLA₂, we found that the Apis has a more specific sequence (with an identity of 24% as compared with PrTX-III) while

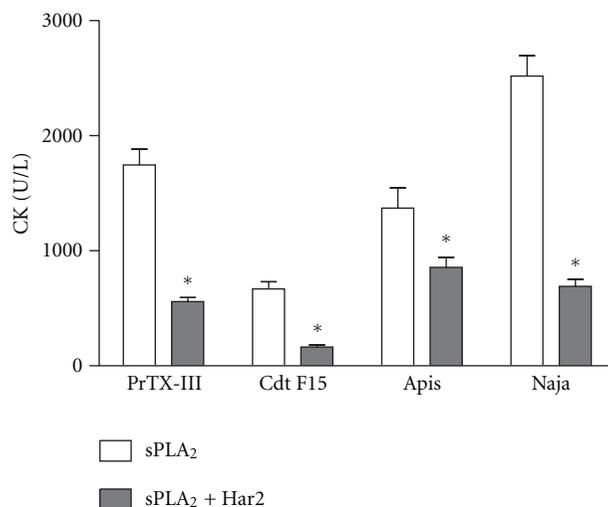


FIGURE 4: Inhibition of myotoxic activity of sPLA₂ (25 μ g/mice) from *Bothrops pirajai* (PrTX-III), *Crotalus durissus terrificus* (Cdt F15), *Apis mellifera* (Apis) and *Naja naja* (Naja) venom expressed as creatine kinase release on plasma. (a) Native sPLA₂ myotoxicity and (b) harpalycin 2 (Har2) treated sPLA₂ myotoxicity. Data expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by ANOVA followed by Dunnett's test, with **P* set at 0.05.

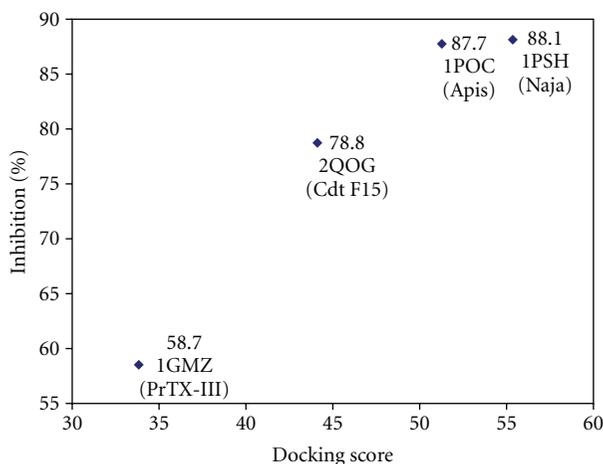


FIGURE 5: Trend between docking scores performed by GOLD 4.0 (*in silico*) and percentages of inhibition of the enzymatic activity (*in vitro*). The values near the points represent the percentage of inhibition for each PLA₂, with the respective PDB ID below. The PDB ID: 1GMZ, 2QOG, 1PSH, and 1POC were used, respectively, for PrTX-III, Cdt F15, Naja, and Apis.

the other three sequences are similar to each other (identity values of 44% for Naja and 57% for Cdt F15, when compared to PrTX-III), Figure 6(a). Considering the secondary and tertiary structures, the difference between the Apis and the others is more relevant. Therefore, we performed a structural alignment only for PrTX-III, Cdt F15, and Naja, using PyMOL [28], as shown in Figure 6(b). The great similarity among these three PLA₂ is probably related to their evolutionary origin from snake venoms, where PrTX-III and Cdt F15 are classified as GIIA, while Naja is classified as GIA). Using the 1PSH (Naja) target as example, because it represents the best result, a detailed inspection for the molecular reasons of the good inhibition behavior of the harpalycin 2 in this target can be found in Figure 7. The most important residues in the active site, including HIS48 and ASP49, are

labeled and are involved in polar interactions with harpalycin 2.

This data corroborates both ethnopharmacological uses of this plant by Brazilian northeast population: the treatment of snake bites, as sPLA₂s are the main toxins in these venoms and, as anti-inflammatory, due to the main role of sPLA₂ in the inflammatory cascade of events. The data also pointed to a possible anti-inflammatory activity of this isoflavone mainly in disorders which involve sPLA₂, such as asthma and rheumatoid arthritis.

Abbreviations

Cdt F15: Crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus*
 COX-1/2: Cyclooxygenase-1/2

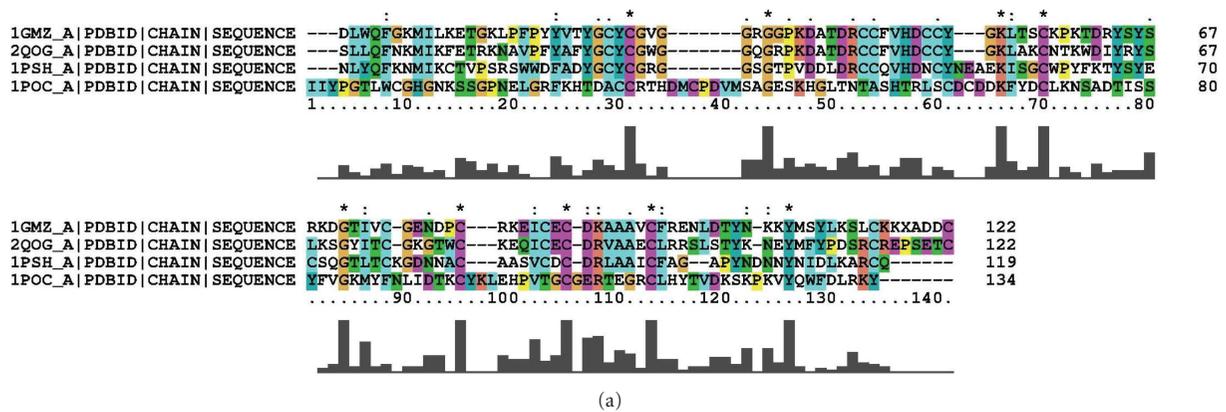


FIGURE 6: (a) Multiple sequence alignment of PrTX-III, Cdt F15, Naja and Apis, with the PDB ID: 1GMZ, 2QOG, 1PSH and 1POC, respectively. ClustalX was used with default setup. (b) Structure alignment of the PLA₂ (cartoon model) with their respective docking solutions for harpalycin 2 (stick model): PrTX-III (green), Cdt F15 (red), and Naja (blue). Figure generated using PyMOL [28].

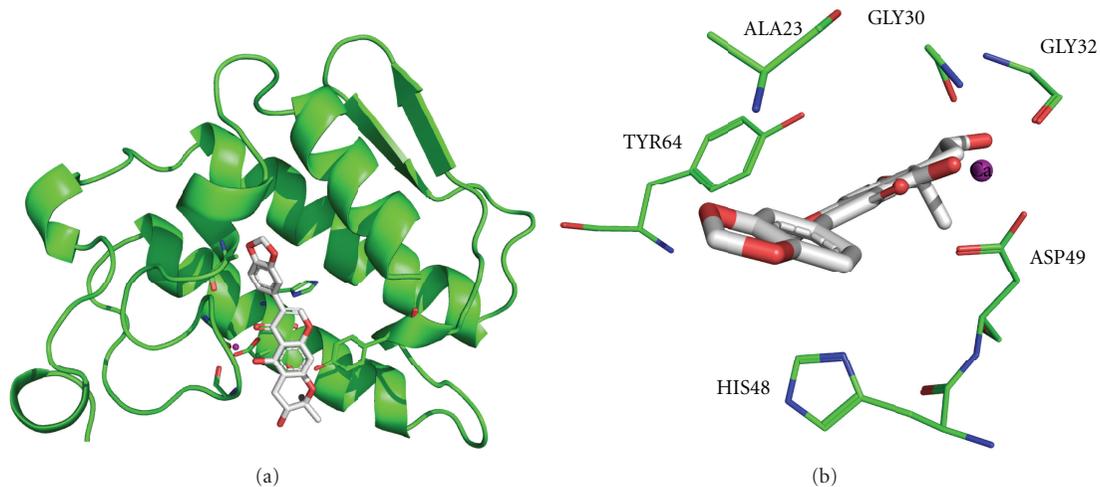


FIGURE 7: Panoramic (a) and detailed (b) view of the best docking solution obtained with the 1PSH (Naja) target. Important residues, directly involved in intermolecular interactions with the inhibitor (harpalycin 2), are labeled. The Ca²⁺ atom of the catalytic center was also represented in the figure.

CK: Creatine kinase
 gVPLA₂: Group V phospholipase A₂
 Har2: Harpalycin 2
 LOX: Lipoxygenase

PAF: Platelet activation factor
 PLA₂: Phospholipase A₂
 PrTX-III: Piratoxin-III
 sPLA₂: Secretory phospholipase A₂.

Authors' Contribution

R. M. Ximenes and M. M. Rabello have contributed equally to this work.

Acknowledgments

This work was financially supported by CAPES (Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), and FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa). The authors would like to thank Sidney Ann Pratt for language revision.

References

- [1] A. García-Lafuente, E. Guillamón, A. Villares, M. A. Rostagno, and J. A. Martínez, "Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease," *Inflammation Research*, vol. 58, no. 9, pp. 537–552, 2009.
- [2] B. H. Havsteen, "The biochemistry and medical significance of the flavonoids," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 96, no. 2-3, pp. 67–202, 2002.
- [3] M. Lindahl and C. Tagesson, "Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂," *Inflammation*, vol. 21, no. 3, pp. 347–356, 1997.
- [4] C. V. Iglesias, R. Aparicio, L. Rodrigues-Simioni et al., "Effects of morin on snake venom phospholipase A₂ (PLA₂)," *Toxicon*, vol. 46, no. 7, pp. 751–758, 2005.
- [5] C. A. Cotrim, S. C. B. De Oliveira, E. B. S. Diz-Filho et al., "Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A₂," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 189, no. 1-2, pp. 9–16, 2011.
- [6] K. K. Dharmappa, R. Mohamed, H. V. Shivaprasad, and B. S. Vishwanath, "Genistein, a potent inhibitor of secretory phospholipase A₂: a new insight in down regulation of inflammation," *Inflammopharmacology*, vol. 18, no. 1, pp. 25–31, 2010.
- [7] G. Lambeau and M. H. Gelb, "Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A₂," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 77, pp. 495–520, 2008.
- [8] B. B. Boyanovsky and N. R. Webb, "Biology of secretory phospholipase A₂," *Cardiovascular Drugs and Therapy*, vol. 23, no. 1, pp. 61–72, 2009.
- [9] B. L. Nanda, A. Nataraju, R. Rajesh, K. S. Rangappa, M. A. Shekar, and B. S. Vishwanath, "PLA₂ mediated arachidonate free radicals: PLA₂ inhibition and neutralization of free radicals by anti-oxidants—a new role as anti-inflammatory molecule," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 7, no. 8, pp. 765–777, 2007.
- [10] J. E. Burke and E. A. Dennis, "Phospholipase A₂ biochemistry," *Cardiovascular Drugs and Therapy*, vol. 23, no. 1, pp. 49–59, 2009.
- [11] K. Hamaguchi, H. Kuwata, K. Yoshihara et al., "Induction of distinct sets of secretory phospholipase A₂ in rodents during inflammation," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1635, no. 1, pp. 37–47, 2003.
- [12] K. K. Dharmappa, R. V. Kumar, A. Nataraju, R. Mohamed, H. V. Shivaprasad, and B. S. Vishwanath, "Anti-inflammatory activity of oleanolic acid by inhibition of secretory phospholipase A₂," *Planta Medica*, vol. 75, no. 3, pp. 211–215, 2009.
- [13] B. Gil, M. J. Sanz, M. C. Terencio, R. Gunasegaran, M. Payá, and M. J. Alcaraz, "Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A₂ with anti-inflammatory activity," *Biochemical Pharmacology*, vol. 53, no. 5, pp. 733–740, 1997.
- [14] G. L. Da Silva, M. I. L. Machado, F. J. D. A. Matos, and R. Braz-Filho, "A new isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliana*," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 10, no. 6, pp. 438–442, 1999.
- [15] M. H. Toyama, D. G. De Oliveira, L. O. S. Beriam, J. C. Novello, L. Rodrigues-Simioni, and S. Marangoni, "Structural, enzymatic and biological properties of new PLA₂ isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom," *Toxicon*, vol. 41, no. 8, pp. 1033–1038, 2003.
- [16] M. H. Toyama, P. D. Costa, J. C. Novello et al., "Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high myotoxic activity," *Protein Journal*, vol. 18, no. 3, pp. 371–378, 1999.
- [17] S. Hernandez-Oliveira, M. H. Toyama, D. O. Toyama, S. Marangoni, S. Hyslop, and L. Rodrigues-Simioni, "Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA₂ from *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom," *Protein Journal*, vol. 24, no. 4, pp. 233–242, 2005.
- [18] D. O. Toyama, S. Marangoni, E. B. S. Diz-Filho, S. C. B. Oliveira, and M. H. Toyama, "Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom," *Toxicon*, vol. 53, no. 4, pp. 417–426, 2009.
- [19] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, and J. J. P. Stewart, "AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 107, no. 13, pp. 3902–3909, 1985.
- [20] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, and R. Taylor, "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking," *Journal of Molecular Biology*, vol. 267, no. 3, pp. 727–748, 1997.
- [21] H. M. Verheij, J. J. Volwerk, E. H. Janse et al., "Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism," *Biochemistry*, vol. 19, no. 4, pp. 743–750, 1980.
- [22] D. L. Scott and P. B. Sigler, "Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A₂," *Advances in Protein Chemistry*, vol. 45, pp. 53–88, 1994.
- [23] M. Cintra-Francischinelli, P. Caccin, A. Chiavegato et al., "Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 32, pp. 14140–14145, 2010.
- [24] B. C. Zychar, C. S. Dale, D. S. Demarchi, and L. R. C. Gonçalves, "Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice," *Toxicon*, vol. 55, no. 2-3, pp. 227–234, 2010.
- [25] L. C. Corrêa, D. P. Marchi-Salvador, A. C. O. Cintra, S. V. Sampaio, A. M. Soares, and M. R. M. Fontes, "Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A₂ with low catalytic activity: insights into Ca²⁺-independent catalytic mechanism," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1784, no. 4, pp. 591–599, 2008.

- [26] S. P. H. Alexander, "Flavonoids as antagonists at A₁ adenosine receptors," *Phytotherapy Research*, vol. 20, no. 11, pp. 1009–1012, 2006.
- [27] J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins, "The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools," *Nucleic Acids Research*, vol. 25, no. 24, pp. 4876–4882, 1997.
- [28] W. L. DeLano, *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, San Carlos, Calif, USA, 2002, <http://pymol.sourceforge.net>.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* venom

Rafael M Ximenes¹, Renata S Alves², Ticiana P Pereira², Renata M Araújo^{3,4}, Edilberto R Silveira⁴, Marcelo M Rabello⁵, Marcelo Z Hernandez⁵, Veronica CG Soares^{6,7}, Daniel Bristot⁷, Camila L Pires⁷, Daniela O Toyama⁸, Henrique H Gaeta⁷, Helena SA Monteiro¹ and Marcos H Toyama^{7*}

Abstract

Background: Harpalycin 2 (HP-2) is an isoflavone isolated from the leaves of *Harpalyce brasiliensis* Benth., a snakeroot found in northeast region of Brazil and used in folk medicine to treat snakebite. Its leaves are said to be anti-inflammatory. Secretory phospholipases A₂ are important toxins found in snake venom and are structurally related to those found in inflammatory conditions in mammals, as in arthritis and atherosclerosis, and for this reason can be valuable tools for searching new anti-phospholipase A₂ drugs.

Methods: HP-2 and piratoxin-III (PrTX-III) were purified through chromatographic techniques. The effect of HP-2 in the enzymatic activity of PrTX-III was carried out using 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid as the substrate. PrTX-III induced platelet aggregation was inhibited by HP-2 when compared to aristolochic acid and p-bromophenacyl bromide (p-BPB). In an attempt to elucidate how HP-2 interacts with PrTX-III, mass spectrometry, circular dichroism and intrinsic fluorescence analysis were performed. Docking scores of the ligands (HP-2, aristolochic acid and p-BPB) using PrTX-III as target were also calculated.

Results: HP-2 inhibited the enzymatic activity of PrTX-III (IC₅₀ 11.34 ± 0.28 µg/mL) although it did not form a stable chemical complex in the active site, since mass spectrometry measurements showed no difference between native (13,837.34 Da) and HP-2 treated PrTX-III (13,856.12 Da). A structural analysis of PrTX-III after treatment with HP-2 showed a decrease in dimerization and a slight protein unfolding. In the platelet aggregation assay, HP-2 previously incubated with PrTX-III inhibited the aggregation when compared with untreated protein. PrTX-III chemical treated with aristolochic acid and p-BPB, two standard PLA₂ inhibitors, showed low inhibitory effects when compared with the HP-2 treatment. Docking scores corroborated these results, showing higher affinity of HP-2 for the PrTX-III target (PDB code: 1GMZ) than aristolochic acid and p-BPB. HP-2 previous incubated with the platelets inhibits the aggregation induced by untreated PrTX-III as well as arachidonic acid.

Conclusion: HP-2 changes the structure of PrTX-III, inhibiting the enzymatic activity of this enzyme. In addition, PrTX-III platelet aggregant activity was inhibited by treatment with HP-2, p-BPB and aristolochic acid, and these results were corroborated by docking scores.

Keywords: PrTX-III, Phospholipase A₂, *Bothrops pirajai*, *Harpalyce brasiliensis*, Isoflavone

* Correspondence: mhtjpn@yahoo.com

⁷São Vicente Unit, State University of São Paulo Júlio Mesquita Filho, UNESP, Praça Infante Dom Henrique, s/n, São Vicente, SP 11330-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Medicinal plants have been used in traditional medicine as an alternative and supplementary therapy to treat snakebite poisoning, and many other health problems, such as inflammatory disorders [1]. In 1982, Nakagawa et al. [2] tested the anti-ophidian activity of “Específico Pessoa”, a Brazilian phytotherapeutic tincture used in folk medicine to treat snakebite, mainly in the Amazon region. Two prenylated pterocarpanes, the cabenegrins A-I and A-II, had been pointed out as responsible for this activity. Several years later, the same compounds were found in *Harpalyce brasiliiana* Benth (Papilionoideae), popularly known in the Northeast of Brazil as “raiz-de-cobra” (Port. Lit.: snake-root). Its roots have been used to treat snakebite [3], while its leaves are claimed to be anti-inflammatory [Personal ethnopharmacological survey].

Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂) are present in most snake venoms and show important neurotoxic and myotoxic activities, and most of them are not fully neutralized by commercial antivenom sera [4]. Flavonoids exhibit different inhibitory levels in group I sPLA₂s from porcine pancreas and *Naja naja* venom, and in group II sPLA₂s from *Vipera russelii* and *Crotalus atrox* venoms. The most important regions involved in the inhibition of sPLA₂ have been reported to be the hydroxyl groups at 30- and 40-positions [5,6]. Iglesias et al. [7] showed that flavonoids such as morin can modify the secondary structure of the snake venom sPLA₂. Toyama et al. [8] showed that 7-hydroxycoumarin interacts with sPLA₂ and causes some structural modifications, indicating its potential use to suppress inflammation induced by sPLA₂.

Group II sPLA₂ enzymes have been found in inflammatory sites in animal models, as well as in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and a number of inflammatory diseases, in which, a correlation between serum sPLA₂ levels and disease activity has been observed [9,10]. Exogenous administration of sPLA₂, such as snake venom sPLA₂, induces and/or exacerbates inflammatory response in animals [11,12]. Structural analyses revealed that snake venom sPLA₂s have a similar molecular profile to those of human secretory PLA₂s as well as a conserved catalytic site [13], thus making them useful tools for the search of new anti-phospholipase A₂ drugs.

Pterocarpanes have been pointed out as possible compounds involved in snakebite protection of “Específico Pessoa”. These molecules are characterized as a group of isoflavonoids formed from isoflavones. Here, the anti-phospholipase activity of harpalycin 2 (HP-2), an isoflavone isolated from the leaves of *Harpalyce brasiliiana* Benth., against PrTX-III was investigated. Aristolochic acid and p-bromophenacyl bromide were used as gold standards sPLA₂ inhibitors. PrTX-III is a catalytically active, hemolytic and platelet aggregant D49 sPLA₂, isolated from the *Bothrops pirajai* venom [14].

Methods

Venom

Bothrops pirajai venom was purchased from Bio-Agents Serpentarium in the city of Batatais (São Paulo, Brazil).

Plant material

Leaves of *Harpalyce brasiliiana* Benth. were collected at the Chapada do Araripe, Barbalha (Ceará, Brazil) by Prof. Edilberto Rocha Silveira. Botanical authentication was made by Prof. Edson P. Nunes of the Department of Biology, Federal University of Ceará. Voucher specimen (number: 32 525) has been deposited at the Prisco Bezerra Herbarium (EAC), Department de Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza (Ceará, Brazil).

General procedures

The mass spectra were obtained on a Hewlett-Packard 5971 mass spectrometer by electron impact ionization (70 eV). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance DRX-500 (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C); chemical shifts were expressed in scale and were referenced to residual DMSO (2.5 and 39.5 ppm). Silica Gel 60 (Merck, 70–230 mesh) was used for analytical TLC. Column chromatographies were performed over silica gel (Merck, 60 F254 230–400 mesh).

Extraction and isolation of harpalycin 2

Leaves of *Harpalyce brasiliiana* were pulverized and extracted with EtOH at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure which produced a dark viscous extract (HBFE). Liquid-liquid partition of a water suspension of HBFE (110 g) using petrol ether, CHCl₃, EtOAc and n-BuOH yielded five fractions after solvent evaporation or lyophilization: HBFEEp (24.5 g), HBFEC (22.4 g), HBFEA (6.8 g), HBFEB (30.4 g) and HBFEAq (21.2 g).

Flash chromatography of HBFEC (12.0 g) using n-hexane and EtOAc as binary mixtures of increasing polarity afforded 30 fractions, which were pooled in 9 fractions after thin layer chromatography (TLC) analysis. HBFEC (10–12) presented a yellow precipitate, yielding 120.0 mg of a white amorphous solid (m.p. 206.9–208.9°C). Spectrometric analysis showed the structure of the isoflavone harpalycin 2. The fractions HBFEC (8–9) and HBFEC (13–17) were purified, using the same method, yielding more 200.0 mg of harpalycin 2 (HP-2).

Purification of PrTX-III

Bothrops pirajai venom was first fractioned in two consecutive chromatographic steps as described by Toyama et al. [15]. Approximately 20 mg of the lyophilized venom was dissolved in 250 μL of 0.05 M ammonium bicarbonate, pH 7.8 (Buffer A). After homogenization, venom solution was clarified by centrifugation at 10,000 rpm for 3 min.

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137 The supernatant was inserted into a Protein Pack SP 5PW
138 column (0.78 x 7.0 cm) and the elution performed using a
139 linear gradient of concentration between 0.05 and 1.0 M
140 ammonium bicarbonate with 750 μ L of 0.1% (v/v) trifluoro-
141 acetic acid (Buffer B). The fractions were collected, lyo-
142 philized and clarified by centrifugation and the supernatant
143 inserted into a μ -Bondapack C18 column (0.78 cm x
144 30 cm) (Waters 991-PDA system). Elution of peaks pro-
145 ceeded with a linear gradient between 0% and 66.5% (v/v)
146 acetonitrile (solvent B) in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid, at
147 a flow rate of 2.0 mL/min. Absorbances were monitored at
148 280 nm. Fractions were collected, lyophilized and stored
149 at -20°C . The PrTX-III fraction was identified by the re-
150 tention time and the measurement of the catalytic activity
151 (since PrTX-III is the activity isoform of *B. pirajai* venom).
152 The purity degree of PrTX-III was evaluated by Tricine
153 SDS-PAGE and by mass spectrometry on a MALDI-TOF
154 mass spectrometer, as previously described [12,16].

155 Measurement of sPLA₂ activity

156 sPLA₂ activity was measured following the protocols
157 described by Lee et al. [13] and modified by Toyama et al.
158 [12] for 96-well plate, using 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic
159 acid (4N3OBA, manufactured by BIOMOL, USA) as the
160 substrate. Enzyme activity, expressed as the initial velocity
161 of the reaction (V_0), was calculated based on the increase
162 in absorbance after 20 min. All assays were performed
163 using $n = 12$ and absorbances at 425 nm were measured
164 using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular
165 Devices, Sunnyvale, CA). After the addition of sPLA₂
166 (20 μ g), the reaction mixture was incubated for 40 min at
167 37°C , and the absorbance read at 10 min intervals. For the
168 estimation of the IC_{50} of harpalycin 2 for PrTX-III, differ-
169 ent concentrations of HP-2 (5, 10, 20, 40 and 80 μ g) were
170 added to each well. The remaining enzymatic assay was
171 conducted as described above. Harpalycin 2 was previously
172 dissolved in DMSO 1%.

173 Incubation of sPLA₂ with harpalycin 2 and purification of 174 HP-2 treated sPLA₂ (PrTX-III: HP-2) and amino 175 acid analysis

176 The incubation of sPLA₂ with HP-2 (w: w; 1:4), followed
177 the procedures described by Iglesias et al. [7]. Briefly, HP-2
178 was dissolved in DMSO 1%. 250 μ L of HP-2 solution was
179 added to 1,000 μ L of homogenized solution of PrTX-III.
180 The mixed solution was incubated for 60 min in a water
181 bath at 37°C . Samples of 200 μ L of this mixture were
182 loaded into a preparative reverse phase HPLC column to
183 separate the treated enzyme (PrTX-III: HP-2) from HP-2.
184 After column equilibration with buffer A (aqueous solution
185 of 0.1% TFA), samples were eluted using a discontinuous
186 gradient of buffer B (66.6% of acetonitrile in 0.1% TFA) at
187 a constant flow rate of 2.0 mL/min. The chromatographic
188 run was monitored at 214 nm for detection of PrTX-III,

PrTX-III: HP-2 and HP-2. 1 nmol of purified protein 189
(PrTX-III or PrTX-III: HP-2) was hydrolyzed with 6 N HCl 190
(200 μ L) in the presence of 10 μ L of phenol solution for 191
prevention of unspecific amino acid oxidation. Amino acid 192
hydrolysis was performed at 106°C for 24 h. After this time, 193
the excess HCl was removed and the hydrolyzed amino 194
acids were rehydrated with a solution of ethanol: water: 195
triethylamine (v: v; 2:2:1). Post-column derivatization was 196
performed with an aqueous solution of phenylisothiocyana- 197
te (ethanol: water: triethylamine: phenylisothiocyanate; v: 198
v; 7:1:1:1). Samples and amino acid standards were deriva- 199
tized using a PICO-TAG amino acid analyzer system 200
(Waters, USA). 201

Molecular exclusion chromatography 202

A molecular exclusion chromatography was initially per- 203
formed using an AP-1 column (Waters, 1x60 cm) previous 204
packed with Superdex 75 (GE Healthcare Pharmacia) as 205
previously described by Oliveira et al. [17]. For molecular 206
exclusion chromatography of the PrTX-III and PrTX-III: 207
HP-2 as well as the protein marker, 1 mg of the protein 208
sample was dissolved in the same buffer used for equilibra- 209
tion of the chromatographic column and sample elution 210
(Potassium phosphate buffer 0.05 M, pH 7.5). Samples 211
were dissolved in 250 μ L of this buffer and then centri- 212
fuged at 4,500 g for 5 minutes. 200 μ L of supernatant was 213
recovered and taken at 37°C for 60 minutes before injec- 214
tion into the column. Injections of 25 μ L of each sample 215
were carried out through the column; and elution of frac- 216
tions was performed under isocratic condition with con- 217
stant flow rate of 0.2 mL/min and monitored at 280 nm. 218

Mass spectrometry 219

The molecular mass of PrTX-III and PrTX-III: HP-2 were 220
determined by matrix-assisted laser desorption ionization- 221
time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a 222
Voyager-DE PRO MALDI-TOF mass spectrometer (Ap- 223
plied Biosystems[®], Life Technologies[™], USA). One micro- 224
liter of samples (PrTX-III and PrTX-III: HP-2) in 0.1% 225
TFA was mixed with 2 μ L of the matrix α -cyano-4-hydro- 226
xycinnamic acid, 50% acetonitrile, and 0.1% TFA (v/v). The 227
matrix was prepared with 30% acetonitrile and 0.1% (v/v) 228
TFA. The equipment conditions were as follows: accelerat- 229
ing voltage of 25 kV, laser fixed at 2,890 μ /com2, delay of 230
300 ns and linear analysis mode. 231

Circular dichroism spectroscopy 232

Purified enzymes - native and HP-2 treated PrTX-III - were 233
dissolved in a 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 234
the final protein concentrations were adjusted to 8.7 mM. 235
After centrifugation at 4,000 g for 5 min, samples were trans- 236
ferred to a 1 mm pathlength quartz cuvette. Circular dichro- 237
ism spectra in the wavelength range of 185–300 nm were 238
acquired in-house with a J720 spectropolarimeter (Jasco[®], 239

240 Japan) using a bandwidth of 1 nm and a response time of
241 1 s. Data collection was performed at room temperature
242 with a scanning speed of 100 nm/min. Nine scans were
243 taken for each sample and all spectra were corrected by
244 subtraction of buffer blanks.

245 Intrinsic fluorescence

246 The relative intrinsic fluorescence intensity of native
247 PrTX-III or HP-2 treated PrTX-III (PrTX-III: HP-2) was
248 monitored with a spectrofluorimeter (Shimadzu[®], Japan).
249 2.0 mL of the reaction mixtures, consisting of 100 mM
250 Tris-HCl buffer (pH 7.4), sPLA₂ (200 µg/mL) and 5 mM
251 CaCl₂, were put into a 10 mm pathlength quartz cuvette.
252 Fluorescence was measured at between 300 and 450 nm
253 after excitation at 280 nm.

254 Platelet aggregation studies

255 The platelet aggregation activities were conducted as
256 described by Oliveira et al. [18] and dos Santos et al. [19].
257 Venous blood was collected with informed consent from
258 healthy volunteers who formally denied taking any medica-
259 tion in the previous 14 days. All experiments using human
260 material were carried out according to Helsinki Declara-
261 tion and were approved by the Ethical Committee for
262 Human Research of State University of Campinas under
263 the no. 0323.0.1.146.000-09. Blood was collected by a two-
264 syringe technique using polypropylene syringes and
265 19-gauge needles, and immediately transferred into poly-
266 propylene tubes containing 1/10 of final volume of 3.8%
267 trisodium citrate. After removing the platelet-rich plasma
268 (PRP), the remaining blood was prepared by centrifugation
269 at 200g for 10 min and the washed platelet solution (WP)
270 was obtained from the residue by centrifugation of citrated
271 blood at 1,500g for 20 min. The platelets were left for
272 1 hour at room temperature to recover their sensitivity to
273 aggregating agents. Platelet counts were performed on a
274 Coulter S Plus (Coulter Electronics, Hialeah, FL) or by
275 phase-contrast microscopy. Platelet aggregation was car-
276 ried out using 400 µL of the washed platelets solution in a
277 cuvette and kept at 37°C with constant stirring. The
278 desired concentration of protein was added and 3 minutes
279 after to the addition, the aggregation was recorded for
280 5–10 min by using an aggregometer (Payton Scientific Inc.,
281 USA). Aggregation experiments were performed with
282 10 µg of PrTX-III and PrTX-III: HP-2., PrTX-III: aristo-
283 lochic acid or PrTX-III: p-bromophenacyl bromide. In
284 order to elucidate HP-2 mode of action, 10 µL of HP-2
285 (5 mg/mL), AACOCF₃ (1 mM) and INDO (1 mM) were
286 added 5 minutes before the addition of native PrTX-III
287 (10 µg) or arachidonic acid (AA, 50 mM).

288 Docking studies

289 The structural optimizations of the harpalycin 2 (HP-2),
290 aristolochic acid (Aris Ac) and p-bromophenacyl bromide

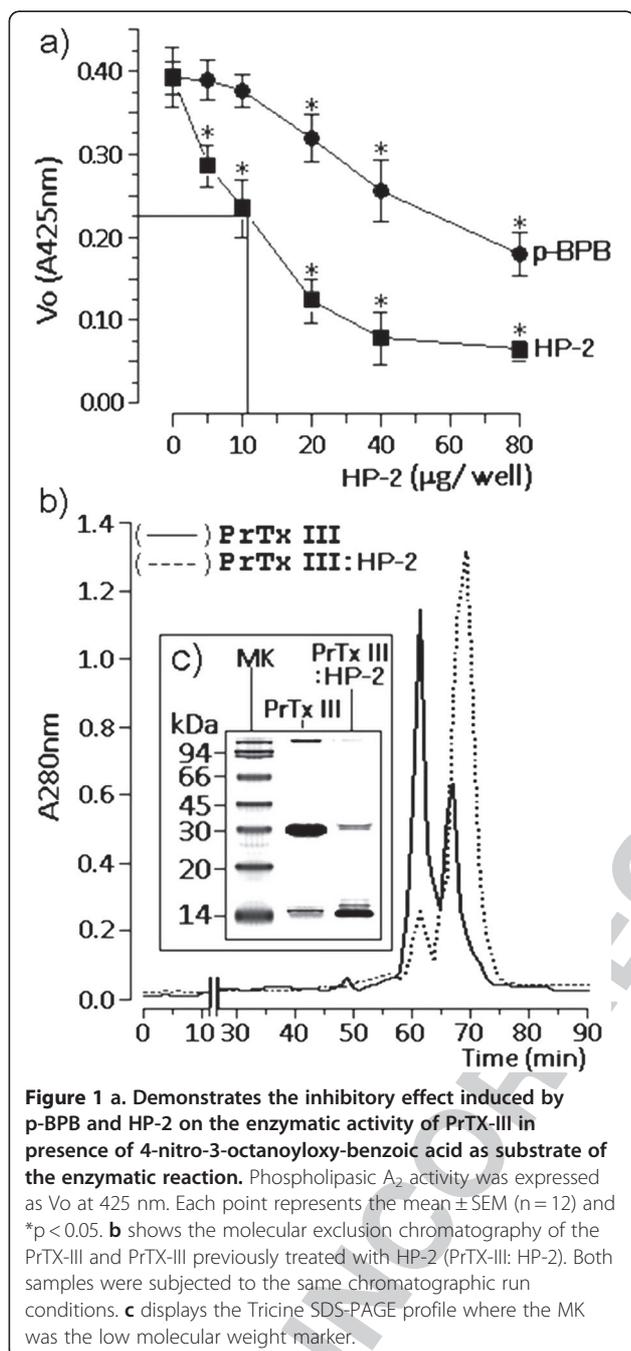
(p-BPB) ligands were initially achieved using the AM1 291
method [20] implemented in the BioMedCache program 292
[21] with default values for the convergence criteria. Dock- 293
ing calculations were performed with the GOLD 4.0 pro- 294
gram [22] to obtain the *in silico* affinity of the ligands with 295
respect to the PrTX-III target. The tridimensional coordi- 296
nates of the target were taken from the RCSB Protein Data 297
Bank (PDB), under the PDB code 1GMZ, as a dimeric quar- 298
ternary structure. The “A” chain was chosen for all the cal- 299
culations. The docking calculations were performed to 300
consider the flexibility of all the ligands and the flexibility 301
of the target, in order to represent the induced fit gener- 302
ated by the presence of non-native ligands, using the fol- 303
lowing approach: the residues Phe5, Ile9, Phe18, Tyr21, 304
Val22, Tyr27, His47, Asp48, Lys60 and Phe96 were config- 305
ured in such a way that their side-chain torsions were con- 306
sidered active during the calculations. The active site was 307
defined as all the atoms within a radius of 8.0 Å from the 308
co-crystallized isopropyl alcohol (IPA). 309

Statistical analysis 310

Results were expressed as mean ± S.E.M. and analyzed by 311
ANOVA followed by Dunnett’s test using GraphPad 312
Prism[®] 5.0 with significance set at $p < 0.05^*$. 313

Results 314

Harpalycin 2 (HP-2) was isolated as a white amorphous 315
solid with m.p. 232.6-234.4°C. Its molecular formula of 316
C₂₁H₁₈O₇ was established by the molecular ion at *m/z* 382 317
Daltons in the MS spectrum. Structure elucidation was 318
performed by spectroscopic means, including 1D and 2D 319
NMR, and comparison with the data from literature [3]. 320
Harpalycin 2 (HP-2) showed a potent inhibitory capacity 321
when compared to the classical sPLA₂ inhibitor p- 322
bromophenacyl bromide (p-BPB), with an IC₅₀ calculated 323
at 11.34 ± 0.28 µg per well, whereas p-BPB showed only a 324
marginal inhibition of PrTX-III catalytic active (Figure 1a). 325 **F1**
The isolation of PrTX-III yielded 15% (w: w). Native PrTX- 326
III subjected to molecular mass exclusion chromatography 327
showed the presence of a main fraction with a molecular 328
mass that was estimated at 25,000 Da and a minor fraction 329
with molecular mass estimated at 14,000 Da. The chroma- 330
tographic profile of PrTX-III: HP-2 revealed the presence 331
of a main fraction, which had its molecular mass estimated 332
at 14,000 Da, and a minor fraction with molecular mass of 333
20,000 Da. According to our data, the main fraction eluted 334
from the sample of PrTX-III: HP-2 represented approxi- 335
mately 90% of the total. These results showed that HP-2 336
treatment of PrTX-III induced a reduction of the 337
dimerization of PrTX-III, while the native PrTX-III showed 338
a typical transition from the monomer to dimer 339
(Figure 1b). The chromatographic results were also corro- 340
borated using a Tricine SDS-PAGE analysis (Figure 1c). 341



342 The reverse phase HPLC profile of native PrTX-III indicated that sPLA₂ fraction was eluted at 31.7 minutes
 343 whereas PrTX-III: HP-2 was eluted at 32.3 minutes, showing a discreet shift in the retention time of this protein
 344 (Figure 2a). The amino acid analysis of native and PrTX-III previously treated with HP-2 did not revealed changes in
 345 the amino acid amount in both samples (Figure 2b). Mass spectrometry data from the native PrTX-III and PrTX-III:
 346 HP-2 showed masses of 13,750.3 Da and 13,736.2 Da, respectively. These results suggest that binding of the HP-2
 347
 348
 349
 350
 351

with PrTX-III did not involve the formation of stable complexes. The discrepancy between results from the molecular
 352 mass HPLC, amino acid analysis and spectrometric studies is probably due to the presence of HCl 6 N used
 353 for rupturing the amino acid bond that could revert the acid condition of some amino acids or restore the H⁺ lost
 354 in the reaction with HP-2 with PrTX-III. This is true for the PICO-TAG amino acid analysis based in the post column
 355 derivatization and the final results also did not differentiate Asp from Asn or Glu from Gln.
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368

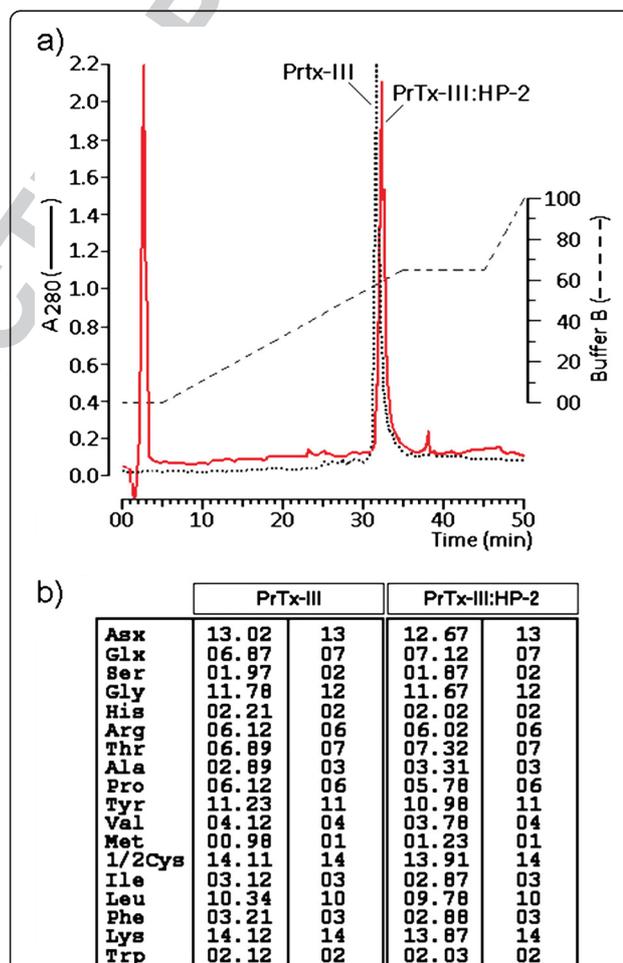


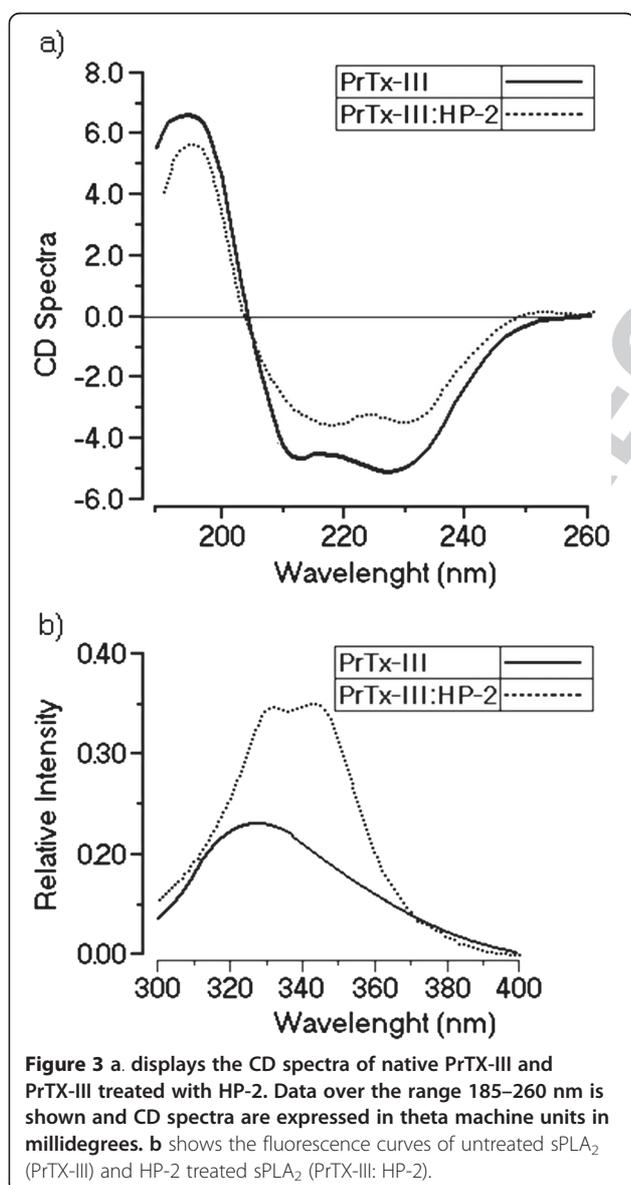
Figure 2 A. Shows the reverse phase HPLC profile of the PrTX-III and the PrTX-III from the incubation with HP-2. Both samples were eluted at same chromatographic conditions using a linear discontinuous increasing of buffer B. The amino acid analysis of PrTX-III and PrTX-III: HP-2. The amino acid counting was expresses as number of each amino acid residues found by each mol of protein.

F4

369 The platelet aggregation observed for native PrTX-III
 370 was blocked by treatment of PrTX-III with HP-2, and partially
 371 inhibited by the treatment with aristolochic acid (Aris
 372 Ac) p-BPB (Figure 4a). Figure 4a also shows that the
 373 PrTX-III treated with HP-2 was able to trigger an initial
 374 platelet aggregation of approximately 20%, which was rapidly
 375 reverted. This effect was not very evident for the treatment
 376 of PrTX-III with aristolochic acid. HP-2 previously
 377 added to the platelets inhibited the aggregating effect
 378 induced by arachidonic acid as well as the effect induced
 379 by PrTX-III (Figure 4b). The effect of HP-2 was similar
 380 that of AAOCE3 (arachidonyl trifluoromethyl ketone), a
 381 specific PLA₂ inhibitor. Previous treatment with indomethacin
 382 only partially inhibited the aggregation induced by
 383 PrTX-III (Figure 4c), showing that the phospholipase A₂

activity is crucial to full platelet aggregation but that the
 PLA₂ downstream cascade is also involved, which was cor-
 roborated by the fact that HP-2 also inhibited arachidonic
 acid induced platelet aggregation.

The superposition of the best docking solutions for
 the harpalycin 2 (HP-2), aristolochic acid and p-
 bromophenacyl bromide ligands can be observed in
 Figure 5. The docking scores for these calculations were
 36.78, 35.29 and 26.63, respectively, showing a better affinity
 between the PrTX-III target and harpalycin 2, in compar-
 ison with aristolochic acid and p-bromophenacyl
 bromide. A detailed inspection of the binding mode of HP-
 2 in PrTX-III can be found in Figure 6. The molecular rea-
 sons for the greater stability (greater docking score) of the
 harpalycin 2 ligand in the active site of the PrTX-III can be
 explained mainly by the presence of some important inter-
 molecular interactions, in particular, a hydrogen bond that
 harpalycin 2 establishes with the residue Asp48, with
 2.88 Å (see Figure 6). The detailed comparison between
 the docking results obtained for these three ligands can be
 found in Table 1.



Discussion

Snake venoms are rich sources of phospholipase A₂ and PLA₂-homologues, active calcium-binding Asp49 enzymes and essentially inactive Lys49 proteins, respectively. They are responsible for multiple pharmacological effects, some of which are dependent on catalytic activity and others of which are not. The pharmacological or biological effects that do not depend on enzymatic activity are driven by other pharmacological regions or sites that include calcium-binding loop, beta-wing and C-terminal region [16,19,23,24]. The precise location or mapping of these pharmacological sites is not easy to find due to the fact that the residues involved in myotoxicity and neurotoxicity significantly overlap, suggesting that multiple biological effects observed in many snake venom PLA₂s are a consequence of superposed structural determinants on the protein surface [24]. However, the consensual idea is that enzymatic activity of PLA₂ is the major factor responsible for the majority of the pharmacological activity induced by the PLA₂ in snake venom, such as inflammatory activity, especially due to the arachidonic acid cleavage [25]. PrTX-III showed a sigmoidal behavior on the substrate concentration, which implies cooperation of substrate binding. This effect has been described for other sPLA₂ such as those isolated from *Bothrops jararacussu* [26] and *Crotalus durissus terrificus* [17] venoms. The transition between the monomers to dimers increases the phospholipase A₂ activity 100 times, which could explain in part the inhibition of PrTX-III by HP-2, since the treatment with HP-2 showed an increase of the monomer form over the dimeric form.

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

T1

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

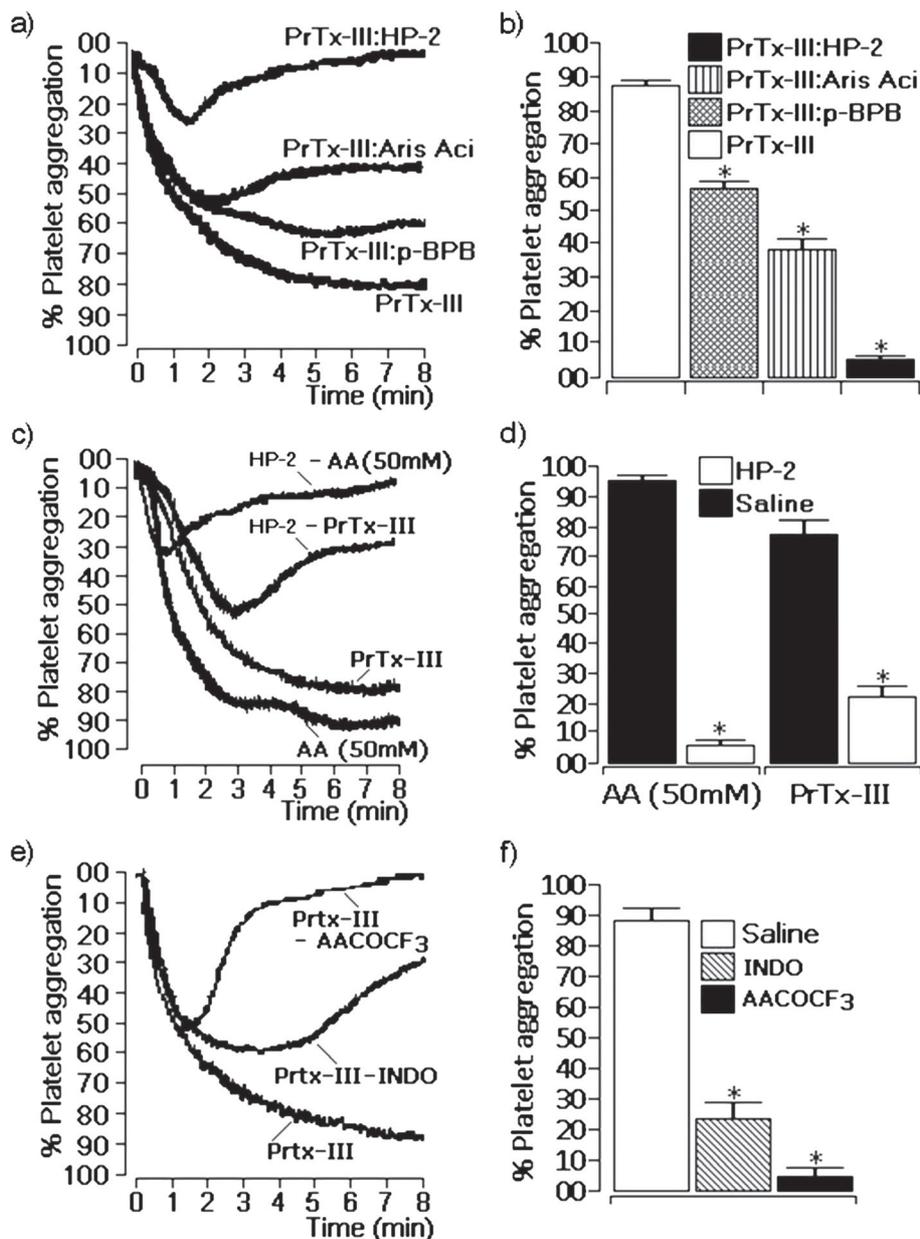


Figure 4 Aggregation assays were performed using a protein concentration of 10 μ g of native PrTX-III or PrTX-III previously treated with harpalycin 2 (HP-2), aristolochic acid (Aris Ac) or p-bromophenacyl bromide (p-BPB) (a). The effect of previous incubation of platelets with HP-2 before the administration of PrTX-III or arachidonic acid is showed in (c). Previous incubation with AACOCF3 or INDO before the administration of PrTX-III is showed in (e). (b), (d) and (f) demonstrate the platelet aggregation results after 8 minutes of experimental condition and each point in the respective table represent the mean \pm SEM (n=4) and *p < 0.05.

436 Crystallographic studies showed that PrTX-III has puta-
 437 tive dimer interface identified in the crystal lattice which
 438 brings together the calcium-binding loops of neighboring
 439 molecules, along with the C-terminal regions which are dis-
 440 sulfide bonded to those loops, thereby offering a possible
 441 route of communication between active sites. The inter-
 442 action of HP-2 with PrTX-III seems to induce a chemical

443 modification of crucial amino acid residues involved in the
 444 sPLA₂ catalysis. It could also modify some important resi-
 445 dues related to the dimer formation, agreeing in CD
 446 spectra and fluorescence measurement which suggests that
 447 HP-2 induced a partial unfolding of PrTX-III. The N-
 448 terminal region as well as the calcium-binding loop and
 449 the alpha-helix of sPLA₂ play an important role for the

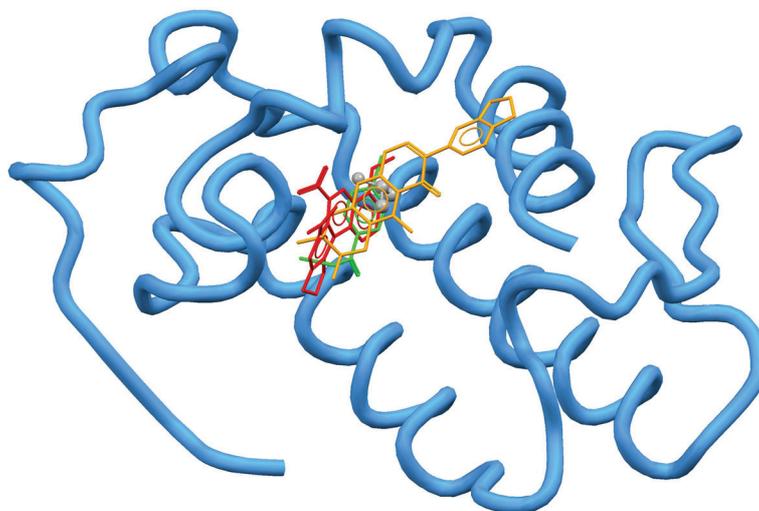


Figure 5 Superposition of the best docking solution for the ligands harpalycin 2, aristolochic acid and p-bromophenacyl bromide (stick models in orange, red and green colors, respectively). The co-crystallized isopropyl alcohol (IPA) is shown as a gray ball model. The hydrogen atoms were omitted for clarity reasons.

450 sPLA₂ catalysis. The modification in these region leads to
451 an irreversible lost of enzymatic activity of sPLA₂ and/or
452 its ability for binding to cell membrane [27].

453 PrTX-III induced a platelet aggregation in a dose
454 dependent manner and this effect was abolished by previ-
455 ous treatment with HP-2. At the beginning of the experi-
456 ment, however, we observed a slight aggregation that was
457 quickly reverted. Previous report by Polgár et al. [28] sug-
458 gests that a glycoposphatidylinositol-anchored platelet-
459 membrane heparan sulphate proteoglycan is the binding
460 site for sPLA₂ on platelets. Some specific mutation studies
461 carried out with PLA₂ have shown that the binding of

secretory PLA₂ to this receptor involves a specific recognition 462
of the CRD region of this receptor, which is located near the 463
catalytic site of PLA₂ and calcium-binding loop 464
[18]. The binding of HP-2 to the active site of PrTX-III 465
could interfere with this ability. The HP-2 effect on the 466
platelet resembles the effect induced by AACOCF₃, which 467
is a selective PLA₂ inhibitor, showing a potential anti- 468
inflammatory effect of harpalycin 2 that could be derived 469
from PLA₂ inhibition. Indomethacin partially inhibited the 470
aggregating effect of PrTX-III pointing to the role of 471
cyclooxygenases in this pharmacological action. HP-2 472
could also being acting in this pathway, since it can block 473

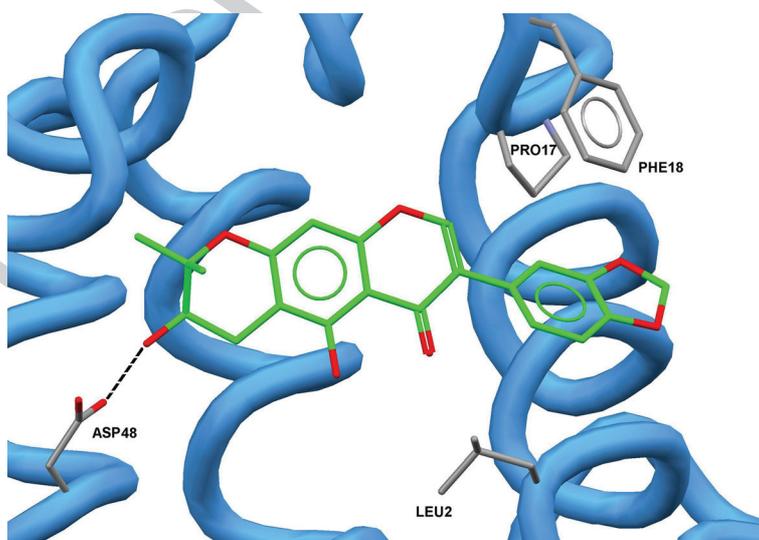


Figure 6 Detailed view of the best docking solution for the harpalycin 2 ligand. The hydrogen bonds are showed in black lines. The hydrogen atoms were omitted for clarity reasons.

t1.1 **Table 1 Details of the docking results and the intermolecular interactions identified for the harpalycin 2 (HP-2),**
t1.2 **aristolochic acid (Aris Ac) and p-bromophenacyl bromide (p-BPB) ligands with the PrTX-III target**

t1.3	HP-2	Aris Ac		p-BPB	
t1.4	inhibition% of platelet aggregation	95	55		35
t1.5	GOLD score	36.78	35.29		26.63
t1.6	Residues	HB	HP	HB	HP
t1.7	LEU2	–	yes	–	–
t1.8	PHE5	–	–	–	yes
t1.9	ILE9	–	–	–	yes
t1.10	PRO17	–	yes	–	yes
t1.11	PHE18	–	yes	–	–
t1.12	TYR21	–	–	–	yes
t1.13	ASP48	2.88	–	–	–
t1.14	PHE96	–	–	–	yes

t1.15 The inhibition% of platelet aggregation data was included for comparison reasons.

t1.16 * HB stands for Hydrogen Bonds and HP for Hydrophobic Interactions.

t1.17 ** All HB distance values are given in Å.

474 the platelet aggregating effect induced by arachidonic acid,
475 which is a step forward in the downstream cascade of
476 PLA₂/COX-1/2/eicosanoids.

477 These experimental results corroborate with the *in silico*
478 observations, where harpalycin 2 ligand presented a greater
479 affinity for the PrTX-III active site, in comparison with the
480 two other ligands (aristolochic acid and p-BPB). This trend
481 implies that the ligands with the best activities have greater
482 stabilities (high docking scores) within the PrTX-III target
483 according to the docking results, and the ligands with the
484 worst activities have weak interactions (low scores) with
485 the same target. These results suggest that the inhibition of
486 platelet aggregation is due to the inhibition of the inter-
487 action between platelet substrate and the sPLA₂.

488 Conclusions

489 Our results of the harpalycin 2 effect on PrTX-III are im-
490 portant as they indicate a possible anti-ophidian and anti-
491 inflammatory activity of this compound and, as well as in
492 part, corroborate the ethnobotanical use that is described
493 for *H. brasiliensis* in the Northeast of Brazil. The *in silico*
494 results also gave us clues about how these molecules inter-
495 act in the active site of phospholipases A₂ inhibiting their
496 enzymatic activity.

497 Abbreviations

498 AA: Arachidonic Acid; AACOCF₃: Arachidonyl Trifluoromethyl Ketone; Aris
499 Ac: Aristolochic Acid; COX-1/2: Cyclooxygenases-1/2; HP-2: Harpalycin 2;
500 INDO: Indomethacin; p-BPB: p-Bromophenacyl Bromide; PLA₂: Phospholipase
501 A₂; PrTX-III: Piratoxin-III; sPLA₂: Secretory Phospholipase A₂.

502 Competing interests

503 The authors declare that they have no competing interests to disclose.

504 Authors' contributions

505 RMX, RSA, VCGS, DB, CLP and HHG were students who were responsible for
506 the biochemical and pharmacological experiments. MMR and MZH were
507 responsible for the docking studies. RMA and ERS collected the botanical
508 material and isolated the compound. DOT, HSAM and MHT were the

coordinators and designed all the studies assays. RMX and MHT drafted the
manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was financially supported by CAPES (Conselho de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), CNPq (Conselho Nacional
de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPESP (Fundação de
Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) e FUNCAP (Fundação Cearense
de Apoio a Pesquisa). Authors also thank to Sidney Ann Pratt for language
revision.

Author details

¹Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará,
UFC, Rua Coronel Nunes de Melo 1127, Fortaleza, CE 60430-270, Brazil.
²Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of
Ceará, UFC, Rua Capitão Francisco Pedro 1210, Fortaleza, CE 60430-370, Brazil.
³Department of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Norte, UFRN,
Av. Senador Salgado Filho 3000, Natal, RN 50078-970, Brazil. ⁴Department of
Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, UFC, Campus
do Pici, Bloco 940, PO Box 12200, Fortaleza, CE 60455-760, Brazil.
⁵Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco,
UFPE, Av. Arthur de Sá, s/n, Recife, PE 50740-520, Brazil. ⁶Department of
Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas, UNICAMP,
Rua Monteiro Lobato 255, Campinas, SP 13082-862, Brazil. ⁷São Vicente Unit,
State University of São Paulo Júlio Mesquita Filho, UNESP, Praça Infante Dom
Henrique, s/n, São Vicente, SP 11330-900, Brazil. ⁸Center of Biological and
Health Sciences, Mackenzie Presbyterian University, Rua da Consolação 896,
São Paulo, SP 01302-970, Brazil.

Received: 16 April 2012 Accepted: 16 August 2012

Published: 27 August 2012

References

1. Pithayanukul P, Ruenraroengsak P, Bavovada R, Pakmanee N, Suttisri R, Saen-
oon S: **Inhibition of *Naja kaouthia* venom activities by plants
polyphenols.** *J Ethnopharmacol* 2007, **97**:527–533.
2. Nakagawa M, Nakanishi K, Darko LL, Vick JA: **Structures of cabenegrins A-I
and A-II, potent anti-snake venoms.** *Tetrahedron Lett* 1982, **23**:3855–3858.
3. Silva GL, Machado ML, Matos FJA, Braz-Filho R, Silveira ER: **A new
isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliensis*.** *J Braz Chem Soc* 1999,
10:438–442.
4. Ximenes RM: **Avaliação da atividade da cabenegrina A-II frente às alterações
bioquímicas e hematológicas e aos efeitos pressóricos induzidos pelo veneno
de *Bothrops jararacussu* em ratos.** Dissertação de Mestrado. Universidade
Federal do Ceará, Departamento de Fisiologia e Farmacologia; 2009.

- 550 5. Lindahl M, Tagesson C: **Flavonoids as phospholipase A₂ inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A₂.** *Inflammation* 1997, **21**:347–453.
- 551
552
- 553 6. Rotelli AE, Guardia T, Juarez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE: **Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation.** *Pharmacol Res* 2003, **48**:601–606.
- 554
555
- 556 7. Iglesias CV, Aparicio R, Rodrigues-Simioni L, Camargo EA, Antunes E, Marangoni S, Toyama DO, Beriam LO, Monteiro HS, Toyama MH: **Effects of morin on snake venom phospholipase A₂ (PLA₂).** *Toxicon* 2005, **46**:751–758.
- 557
558
559
- 560 8. Toyama DO, Marangoni S, Diz-Filho EBS, Oliveira SCB, Toyama MH: **Effect of Umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom.** *Toxicon* 2009, **53**:417–426.
- 561
562
563
564
- 565 9. Cirino G: **Multiple control in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A₂, inducible and constitutive cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase.** *Biochem Pharmacol* 1985, **55**:105–111.
- 566
567
- 568 10. Fuentes L, Hernandez M, Nieto ML, Crespo MS: **Biological effects of group IIA secreted phospholipase A₂.** *FEBS Lett* 2002, **531**:7–11.
- 569
- 570 11. Gil B, Sanz MJ, Terencio MC, Gunasegaran R, Payá M, Alcaraz MJ: **Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A₂ with anti-inflammatory activity.** *Biochem Pharmacol* 1997, **53**:733–740.
- 571
572
573
- 574 12. Toyama MH, de Oliveira DG, Beriam LO, Novello JC, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S: **Structural, enzymatic and biological properties of new PLA (2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom.** *Toxicon* 2003, **41**:1033–1038.
- 575
576
577
- 578 13. Lee WH, Toyama MH, Soares AM, Giglio JR, Marangoni S, Polikarpov I: **Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of piratoxin III, a D-49 phospholipase A(2) from the venom of *Bothrops pirajai*.** *Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr* 1999, **55**:1229–1230.
- 579
580
581
- 582 14. Soares AM, Andrião-Escarso SH, Bortoleto RK, Rodrigues-Simioni L, Arni RK, Ward RJ, Gutiérrez JM, Giglio JR: **Dissociation of Enzymatic and Pharmacological Properties of Piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom.** *Arc Biochem Biophys* 2001, **387**:188–196.
- 583
584
585
586
- 587 15. Toyama MH, Costa PD, Novello JC, de Oliveira B, Giglio JR, da Cruz-Höfling MA, Marangoni S: **Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D-49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high myotoxic activity.** *J Protein Chem* 1999, **18**:371–378.
- 588
589
590
591
- 592 16. Toyama MH, Toyama DO, Joazeiro PP, Carneiro EM, Beriam LO, Marangoni S, Boschero AC: **Biological and structural characterization of a new PLA₂ from the *Crotalus durissus collilineatus* venom.** *Protein J* 2005, **24**:103–112.
- 593
594
- 595 17. Oliveira DG, Toyama MH, Novello JC, Beriam LO, Marangoni S: **Structural and functional characterization of basic PLA₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom.** *J Protein Chem* 2002, **21**:161–168.
- 596
597
- 598 18. Oliveira SC, Fonseca FV, Antunes E, Camargo EA, Morganti RP, Aparicio R, Toyama DO, Beriam LO, Nunes EV, Cavada BS, Nagano CS, Sampaio AH, Nascimento KS, Toyama MH: **Modulation of the pharmacological effects of enzymatically-active PLA₂ by BTL-2, an isolectin isolated from the *Bryothamnion triquetrum* red alga.** *BMC Biochem* 2008, **9**:16.
- 599
600
601
602
- 603 19. dos Santos ML, Fagundes FH, Teixeira BR, Toyama MH, Aparicio R: **Purification and Preliminary Crystallographic Analysis of a New Lys49-PLA₂ from *B. Jararacussu*.** *Int J Mol Sci* 2008, **9**:736–750.
- 604
605
- 606 20. Dewar MJS, Zoebisch EG, Healy EF, Stewart JJP: **Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model.** *J Am Chem Soc* 1985, **107**:3902–3909.
- 607
608
609
- 610 21. *BioMedCache version 6.1, Copyright© 2000–2003 Fujitsu Limited, Copyright© 1989–2000: Oxford Molecular Ltd; http://www.CACheSoftware.com.*
- 611
- 612 22. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R: **Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking.** *J Mol Biol* 1997, **267**:727–748.
- 613
614
- 615 23. Lomonte B, Angulo Y, Calderón L: **An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action.** *Toxicon* 2003, **42**:885–901.
- 616
617
- 618 24. Chioato L, Ward RJ: **Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis.** *Toxicon* 2003, **42**:869–883.
- 619
620
25. Yedgar S, Cohen Y, Shoseyov D: **Control of phospholipase A₂ activities for the treatment of inflammatory conditions.** *Biochim Biophys Acta* 2006, **1761**:1373–1382.
- 621
622
623
26. Bonfim VL, Toyama MH, Novello JC, Hyslop S, Oliveira CR, Rodrigues-Simioni L, Marangoni S: **Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom.** *J Protein Chem* 2001, **20**:239–234.
- 624
625
626
627
27. Berg OG, Gelb MH, Tsai MD, Jain MK: **Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A₂-paradigm.** *Chem Rev* 2001, **101**:2613–2653.
- 628
629
28. Polgár J, Kramer RM, Um SL, Jakubowski JA, Clemetson KJ: **Human group II 14 kDa phospholipase A₂ activates human platelets.** *Biochem J* 1997, **327**:259–265.
- 630
631
632

doi:10.1186/1472-6882-12-139

Cite this article as: Ximenes et al.: Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* venom. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2012 **12**:139.

633
634
635
636
637

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

